

19



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

**"ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA
PARA EL ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD
DEL ARN MENSAJERO EN CELULAS
EUCARIOTICAS"**

2023

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

RICARDO GONZALEZ RAMIREZ

ASESORES: DR. JAIME GARCIA MENA

DRA. CECILIA MONTAÑEZ OJEDA

M. EN C. ALBERTO NATAHLIEL SOTO GUEVARA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
 INSTITUTO NACIONAL
 DE ESTADÍSTICA Y CENSO
 DE MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. E. M.
 FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
 P R E S E N T E .

AT'N: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes. nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Establecimiento de un sistema para el estudio de la
estabilidad del ARN mensajero en células eucarióticas"

que presenta el pasante: Ricardo González Ramírez

con número de cuenta: 9460083-2 para obtener el TITULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 8 de Noviembre de 1 2000

PRESIDENTE M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL Q.F.B.Ma. Esther Revuelta Miranda

SECRETARIO M.en C. Alberto Natahliel Soto Guevara

PRIMER SUPLENTE Q. B. P. Judith Martínez Zamitiz

SEGUNDO SUPLENTE Q. F. B. Rosalba Bonilla Sánchez

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jaime:

Le agradezco por guiarme a lo largo del desarrollo del trabajo y por el apoyo y la confianza que he recibido de su parte.

A Natahriel:

Por apoyarme en este trabajo y por su amistad incondicional.

A la empresa KPL:

Por la donación de algunos reactivos utilizados a lo largo del desarrollo experimental.

A la empresa AccesoLab:

Por proporcionar la mayor parte de los reactivos utilizados.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. ¿Por qué estudiar a los tripletes repetidos?	4
1.2. Las expansiones de los tripletes repetidos conducen a enfermedades humanas	5
1.3. Propiedades estructurales de los tripletes repetidos	8
1.3.1. Tallo burbuja	8
1.3.2. Cadena triple de ADN (triplex)	9
1.3.3. Cadena cuádruple de ADN (tetraplex)	9
1.3.4. Deslizamiento de cadenas de ADN	10
1.4. Inestabilidad de los tripletes repetidos	10
1.5. ¿Por qué ocurre la expansión de los tripletes?	12
1.6. ¿Por qué medir la estabilidad del ARNm?	13

2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivos generales	17
2.2. Objetivos particulares	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Plásmidos de trabajo	19
3.2. Cepas Bacterianas	20
3.3. Medios de Cultivo	20
3.3.1. Medio de cultivo para bacterias	20
3.3.2. Medio de cultivo para células SH-SY-5Y	21
3.4. Transformación de bacterias	21
3.4.1. Nitógeno líquido	21
3.4.2. Cloruro de calcio	22
3.5. Manejo de células SH-SY-5Y	22
3.5.1. Descongelamiento de células SH-SY-5Y	22
3.5.2. Pase de células de células SH-SY-5Y	23
3.5.3. Congelación de células SH-SY-5Y	24
3.5.4. Transfección	24
3.5.4.1. Transfección en monocapa mediada por fosfato de calcio	24
3.5.4.2. Transfección en monocapa con Lipofectamina Plus	25
3.5.4.3. Transfección mediada por fosfato de calcio en suspensión	26

3.5.4.4. Ensayo de la capacidad de transfección	26
3.6. Manejo de oligonucleótidos	27
3.6.1. Alineamiento de oligonucleótidos	28
3.6.2. Fosforilación y ligación de oligonucleótidos	29
3.6.3. Amplificación y expansión de tripletes repetidos por PCR	30
3.7. Extracción de ADN plasmídico	31
3.7.1. Extracción a mediana escala por lisis alcalina y lizosima	31
3.7.2. Extracción a mediana escala por el Plasmid Maxi Kit de Qiagen	32
3.7.3. Mini extracción de plásmido por Quiaprep Spin Miniprep Kit de Qiagen	32
3.8. Manejo de ADN	33
3.8.1. Reacciones de restricción	33
3.8.2. Reacción Klenow	33
3.8.3. Reacciones de ligación	34
4. RESULTADOS	35
4.1. Construcción de los plásmidos pSV α 1, pBBB y pSVB10 <i>in silico</i>	35
4.2. Transfección de las células SH-SY-5Y	36
4.3. Expansión de tripletes repetidos	37
4.3.1. Alineamiento de oligonucleótidos	37
4.3.2. Fosforilación y ligación de ADN de doble cadena	37
4.3.3. Amplificación y expansión de tripletes repetidos por PCR	39

4.3.4. Amplificación y expansión de tripletes repetidos con un sitio de restricción en sus extremos	40
4.3.5. Restricción de las expansiones de tripletes repetidos con la enzima Bgl II y la eliminación de los tripletes de bajo peso molecular producidos por la restricción	43
4.4. Construcción de vectores para la producción de ribosondas	44
4.4.1. Construcción del plásmido pT7T3- β -globina	44
4.4.2. Construcción del plásmido pT7T3- α -globina	45
TABLAS Y FIGURAS	47
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	81
6.1 . Construcción de plásmidos in silico	81
6.2. Transfección de células SH-SY-5Y	81
6.3. Expansión de tripletes repetidos	82
6.4. Construcción de vectores para la producción de ribosondas	85
CONCLUSIONES	86
REFERENCIAS	87

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
HD	Enfermedad de Huntington
SBMA	Atrofia espino-bulbomuscular
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Trifosfato de adenosina
dATP	Deoxi-trifosfato de adenosina
dCTP	Deoxi-trifosfato de citosina
dGTP	Deoxi-trifosfato de guanosina
DM	Distrofia miotónica
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Deoxi-trifosfato de timina
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
FraX	Síndrome del X frágil
HBS	Solución balanceada de Hank
LB	Medio Luria.Bertoni
PBS	Buffer de fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SCA	Ataxia espinocerebral
SFB	Suero fetal bovino

SSC	Citrato de sodio salino
TE	Tris-HCl, EDTA
Tm	Temperatura de alineamineto
Tris-HCl	Tris-hidroximetil-aminometano

RESUMEN .

RESUMEN

En este trabajo se establecen las condiciones adecuadas para la expansión in vitro de los tripletes repetidos asociados con enfermedades genéticas humanas CCg/ggC, CTg/AgC, TTC/AAg y un trinucleótido repetido no asociado a ninguna enfermedad gAC/TCg, estas expansiones logran tener un peso molecular elevado, por encima de 8454 bp. La reacción de PCR es la técnica por medio de la cual se realizaron las expansiones. Un factor importante para lograr las expansiones de los tripletes fue el ión magnesio (en forma de Mg Cl₂). Para la amplificación de todos los trinucleótidos sin el sitio Bgl II la concentración óptima fue de 9.0 mM. En el caso de los trinucleótidos que contienen el sitio Bgl II la concentración fue para cada triplete diferente. Para CCg/ggC la concentración óptima de este ion fue de 9.5 mM; para CTg/AgC fue de 10.5 mM; para TTC/AAg de 5.5 mM y para gAC/TCg fue de 9.0 mM.

También se optimizó la transfección de las células SH-SY-5Y en suspensión lográndose disminuir la variación en la capacidad de transfección hasta un 1.81%. Se construyeron dos vectores para la producción de dos ribosondas. Un plásmido pT7T3-β-globina para producir la ribosonda complementaria al segundo exón del gen de la β-globina de conejo y el segundo plásmido el pT7T3-α-globina para la producción de la ribosonda complementaria al tercer exón del gen de la α-globina humana.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ¿Por qué estudiar a los tripletes repetidos?

Desde hace una década aproximadamente, se conoce que muchas enfermedades neurodegenerativas son causadas por la expansión de tripletes repetidos en el ADN (Wells *et al* 1998). Hasta la fecha, más de doce enfermedades genéticas humanas se han asociado con la expansión de los tripletes CTg/AgC, CCG/ggC y TTC/AAg. Esta expansión de tripletes repetidos representa un nuevo tipo de evento mutagénico que no se había identificado.

La sobrevivencia y la adaptación de una especie requiere del balance entre la reparación de los errores inherentes en la replicación o en la recombinación y la introducción de mutaciones ocasionales que favorezcan la selección natural. Este balance es complejo porque no todas las secuencias sufren mutaciones con el mismo grado. Las mutaciones espontáneas son frecuentemente asociadas con secuencias repetidas de ADN, incluyendo a repetidos invertidos, repetidos de un solo nucleótido y las repeticiones de di-, tri-, tetra- o de un orden mayor de nucleótidos (Sinden 1999). Por lo tanto, una alta frecuencia de mutación espontánea asociada con los tripletes repetidos no es sorprendente.

El ADN no solo debe ser considerado como un depósito de información en el cual se encuentran codificados el ARN y las proteínas.

Arreglos particulares de secuencias de ADN son responsables de la estructura de la doble hélice del ADN, incluyendo el plegamiento y las variaciones en la estructura tridimensional de la hélice (Bianchi 1998). Los arreglos que llega a tomar el ADN pueden conducir a eventos mutacionales específicos y afectar la expresión genética. Las expansiones de los tripletes repetidos provocan cambios conformacionales del ADN. Estos cambios le confieren un grado mayor de inestabilidad y hacen a estas secuencias más sensibles a mutaciones. Por las razones expuestas es necesario conocer el comportamiento de las expansiones de los tripletes repetidos y su relación con las enfermedades genéticas humanas.

2. Las expansiones de los tripletes repetidos conducen a enfermedades humanas

El grupo de enfermedades neurológicas y neuromusculares asociadas con las expansiones de algunos tripletes repetidos sigue aumentando. Los trinucleótidos repetidos están presentes normalmente en nuestro genoma y pueden afectar la expresión de ciertos genes cuando están localizados dentro o muy cerca del gen. Bajo ciertas circunstancias los tripletes repetidos aumenta hasta cierto número, en este punto la expansión del número de tripletes repetidos se convierte en una mutación que induce una enfermedad (Timchenko *et al.*, 1999).

El mecanismo mediante el cual la inestabilidad de estos tripletes causa su amplificación sigue aún sin conocerse, pero ha sido objeto de una intensiva investigación. Pese a esto se han propuesto diferentes modelos para explicar como ocurren este tipo de expansiones y se discuten más adelante.

Las enfermedades relacionadas a los tripletes tienen en común ciertas características pero son muy diferentes en otras. Todas las enfermedades se caracterizan por inestabilidad mitótica y meiótica (Paulson *et al.*, 1996). En general, la expansión del triplete repetido continúa en la progenie del individuo afectado, aumentando la severidad de la enfermedad o incrementando la posibilidad de que la enfermedad se presente a edad temprana. Este fenómeno se conoce como *anticipación*. Un individuo afectado con alguna de estas enfermedades típicamente contiene >50 repeticiones de tripletes dentro de un gen específico, mientras que un individuo sano contiene <30 repeticiones (Ashley *et al.*, 1995).

Basándose en las similitudes y las características específicas de las mutaciones, las enfermedades asociadas a los tripletes repetidos han sido clasificadas en dos tipos, llamados tipo I y tipo II. El tipo I incluye enfermedades asociadas con pérdida neuronal. Los miembros de este grupo son enfermedad de Huntington (HD), atrofia espino y bulbomuscular (SBMA), ataxia espinocerebral tipo 3 (enfermedad de Machado-Joseph, MJD SCA3) y las ataxias espinocerebrales tipo 1 y 2 (tabla 1). Todas las enfermedades pertenecientes a este grupo tienen la expansión del triplete CAG en la región codificante de varios genes (figura 1), resultando en la síntesis de segmentos de poliglutamina en las proteínas. La mayoría de estas enfermedades son autosómicas dominantes, excepto SBMA.

Dentro de las enfermedades agrupadas como tipo II se encuentran el síndrome del X frágil (FraX) o síndrome de Martín Bell, ataxia de Friedrich (FRDA) y la distrofia miotónica (DM). Estas enfermedades se caracterizan por la complejidad en los síntomas. DM se asocia con músculo esquelético, los pacientes con la mutación DM tienen anomalías en corazón, cerebro, piel y ojos. FraX es una enfermedad que se caracteriza principalmente por anomalías testiculares y faciales, retardo mental. FRDA es una enfermedad neurodegenerativa que involucra al sistema nervioso central y al periférico. Hay diferentes secuencias de tripletes relacionadas con estos desordenes. FraX involucra la expansión del triplete CGG (Kremer *et al.*, 1991 y Verkerk *et al.*, 1991) y la DM con la expansión de CTG (Aslanidis *et al.*, 1992 y Brook *et al.*, 1992). Todo parecía ser que secuencias ricas en G-C eran asociadas a estas enfermedades, sin embargo en 1996 se describió que el repetido GAA se encontraba expandido en FRDA (Campuzano *et al.*, 1996) cambiando la idea original. Aparentemente cualquier triplete repetido puede ser inestable en ciertas condiciones. En estas enfermedades la expansión del triplete se encuentra localizada en la región 5' no traducida del gen FMRI en FraX, en la región 3' no traducida del DMPK en DM y en el primer intrón en el gen de la frataxina en FRDA (figura 1).

Una característica distinguible entre las enfermedades del tipo I y II es el contraste en el largo de la expansión (tabla 1). En las tipo I el largo del repetido en los individuos afectados fluctúa de 40 a 70, mientras en las enfermedades del tipo II el tamaño del repetido va de 50 a varios miles de repetidos.

3. Propiedades estructurales de los tripletes repetidos

Las moléculas lineales de ADN que contienen tripletes repetidos migran en un gel de poliacrilamida de una forma anormal. Esta propiedad inesperada indica inmediatamente que una secuencia de ADN adopta estructuras inusuales con nuevas propiedades biofísicas. Una característica de los tripletes repetidos es su elevada flexibilidad (Chastain *et al.*, 1995). Chastain y Sinden (1998) demostraron que pequeñas secuencias de tripletes repetidos le confieren al ADN un alto grado de flexibilidad. Debido a esta característica el ADN que contiene secuencias de tripletes repetidos puede adoptar diversas conformaciones estructurales (Mitas 1997). Diferentes estructuras de tallo burbuja o hasta estructuras de cuatro cadenas (tetraplex) pueden formarse con una sola cadena de tripletes repetidos de la forma CXG (donde X puede ser cualquier nucleótido). De la misma forma estructuras de tres cadenas (triplex) pueden formarse con los repetidos $(GAA)_n$ y $(TTC)_n$. En seguida se describen las diversas estructuras que pueden adoptar las secuencias de tripletes repetidos.

3.1. Tallo Burbuja

Cadenas sencillas de repeticiones de $(CTG)_n$, $(CAG)_n$, $(CGG)_n$ y $(CCG)_n$ forman estructuras de tallo burbuja estabilizadas por el apareamiento de bases del triplete repetido (Yu *et al.*, 1995 y Mariappan *et al.*, 1996). Cadenas de $(CGG)_n$ o $(CCG)_n$ pueden plegarse en una estructura de tallo burbuja de dos formas diferentes. La primera involucra a un par de bases mal apareado de tipo G•G y la segunda con un par mal apareado de tipo C•C.

En contraste, los repetidos (CTG)_n forman un solo tipo de tallo burbuja con un par de bases mal apareadas T•T y (CAG)_n con un par A•A. (figura 2A). Como es de esperarse, la estabilidad de estas estructuras varía considerablemente. Por ejemplo, el tallo burbuja formado con los repetidos (CTG)_n es más estable que el tallo burbuja formado por los repetidos (CAG)_n (Rosche *et al.*, 1996).

1.3.2. Cadena triple de ADN (triplex)

La formación de triplex con el repetido GAA (figura 2B) se favorecida en condiciones de bajo pH y ADN superenrollado, estas condiciones pueden existir dentro de una célula. Este tipo de secuencias que forman estas estructuras pueden bloquear efectivamente la replicación del ADN *in vitro* e *in vivo* (Krasilnikov *et al.*, 1997). Se piensa que la maquinaria de replicación hace una pausa que es ocasionada por la disociación de la cadena naciente de ADN y la formación del triplex.

1.3.3. Cadena cuádruple de ADN (tetraplex)

Las secuencias de ADN ricas en guanina pueden formar estructuras de tipo tetraplex, las bases se pueden unir mediante el enlace de tipo Hoogsteen (figura 2C). Tripletes repetidos como CGG; AGG y TGG forman una gran variedad de estructuras de este tipo (Urdin 1998). La formación de estas estructuras requieren de segmentos muy grandes de repetidos, para llegar a los tetraplex se necesita pasar primero por un intermediario, un tallo. Al igual que los triplex pueden bloquear la replicación o la transcripción de ADN.

1.3.4. Deslizamiento de cadenas de ADN

El deslizamiento de cadenas de ADN puede ocurrir cuando los tripletes repetidos forman dos tallos burbujas en cada una de las cadenas de ADN provocando la pérdida de la alineación original con el que se encontraban apareadas bases (Pearson *et al.*, 1996 y figura 2D). Después de la desnaturalización y la renaturalización de los tripletes repetidos CTG o CGG una alta proporción de poblaciones de ADN adoptan una conformación alternativa que puede ser deducida por el retardamineto en la movilidad de estas moléculas en geles de poliacrilamida (Gacy *et al.*, 1998). El deslizamiento es proporcional al tamaño de los tripletes repetidos. Como los tallos en estas estructuras son complementarios es muy posible que lleguen en cierto momento a doblarse y formar una estructura más compleja (figura 2D).

Es posible que la formación de este tipo de estructuras sea la causante de la expansión de las secuencias de los tripletes repetidos. Su alta inestabilidad es un indicio de esta suposición, sin embargo, se necesita estudiar aún más todos los mecanismos moleculares asociados a los tripletes repetidos para poder describir con certeza el mecanismo mediante el cual los tripletes repetidos se expanden.

1.4. Inestabilidad de los tripletes repetidos

Una característica remarcable de los tripletes repetidos es la inusual expansión en enfermedades como el síndrome del X frágil, distrofia miotónica y la ataxia de Friedrich.

Este tipo de evento mutagénico no había sido observado antes del descubrimiento de las bases moleculares de estas enfermedades genéticas. Desafortunadamente estas expansiones masivas no han podido ser duplicadas en un modelo más simple y permanecen como una característica única de la genética humana. Sin embargo, estudios realizados en otros organismos revelan algunas propiedades interesantes de los tripletes repetidos.

En general, los tripletes repetidos, especialmente los que son muy largos, son muy inestables en *E.coli* y en levaduras. Además, la orientación de los tripletes repetidos puede variar su estabilidad (Freudenreich *et al.*, 1997). Como ejemplo tenemos que secuencias de CTG son más propensas a eliminaciones cuando el triplete se encuentra en la cadena retardada del ADN. Contrariamente, cuando se encuentran en la cadena líder la expansión del triplete se ve favorecida (Kang *et al.*, 1995). La inestabilidad en el proceso de replicación del triplete CTG puede ser explicado por la diferente estabilidad de los tallo-burbujas formados por $(CTG)_n$ o por $(CAG)_n$ y por las diferentes propiedades bioquímicas asociadas con la replicación de la cadena líder y la cadena retardada. La probabilidad de que un tallo burbuja se forme en la cadena retardada es mayor debido a que durante la replicación del ADN esta cadena esta desapareada y existe como una sola cadena. El largo de esta cadena es siempre igual al tamaño del fragmento de Okazaki. Si en la cadena no se unen proteínas se puede plegar formando la estructura de tallo burbuja. Cuando en la cadena retardada se encuentra el triplete CTG se forman una gran cantidad de estas estructuras. La formación del tallo burbuja conduce entonces a una eliminación (figura 3A).

Si el triplete CAG se encuentra en la cadena retardada hay menor probabilidad que se forme un tallo burbuja y lleve a una eliminación por lo que hay una expansión (figura 3B), en el caso contrario un tallo burbuja formado por el triplete CTG en la cadena líder causa una eliminación (figura 3C). Pequeñas eliminaciones e inserciones de un solo triplete repetido pueden ocurrir por un mal alineamiento del primer y el templado, este proceso involucra a solo tres pares de bases (figura 3D). Evidencias recientes han mostrado que tales eventos ocurren frecuentemente en *E.coli*, y que se observan por una asimetría en las cadenas de ADN. Estos eventos de deslizamiento de una de las cadenas que involucran a solo tres pares de bases son fácilmente reconocidos por el sistema de reparación de las bacterias. Mientras que un deslizamiento de más de seis pares de bases no puede ser reconocido (Schumacher *et al.*, 1998).

1.5. ¿Por qué ocurre la expansión de los tripletes?

Numerosos modelos han sido propuestos para explicar la expansión de los tripletes repetidos que conducen a las enfermedades humanas. Las expansiones y las eliminaciones pueden ocurrir por la mala alineación de los primers durante la replicación de las secuencias que contienen tripletes repetidos. Como se discutirá adelante el deslizamiento del primer en el extremo 3' del fragmento de Okazaki puede originar la expansión de los tripletes repetidos. Una simple recombinación puede originar la duplicación o posiblemente triplicar el largo del repetido, este mecanismo no puede explicar fácilmente el evento de expansión y la magnitud observada en el síndrome del X frágil o la distrofia miotónica.

Sin embargo, la recombinación puede estar involucrada en pequeñas expansiones observadas en otras enfermedades. Los eventos repetitivos de mal alineamiento en la síntesis de ADN podría originar expansiones tan largas como el largo del segmento de los tripletes repetidos original. Sinden y Wells (1992) sugieren que la expansión masiva puede resultar de la síntesis reiterativa del ADN, esto es, cuando la ADN polimerasa encuentra un bloqueo en el transcurso de la replicación. Este modelo por si sólo puede explicar fácilmente la expansión de cientos a miles de tripletes repetidos en un solo paso (figura 4).

6. ¿Por qué medir la estabilidad del ARNm?

Uno de los mayores intereses de las investigaciones médicas es el entendimiento de la respuesta específica de una célula en ciertas enfermedades. Otro aspecto es el monitoreo del comportamiento específico de la célula a lo largo de la enfermedad. Como una consecuencia, el conocimiento en la expresión de uno o varios genes, los cuales están involucrados en el desarrollo de la célula puede ser una buena base para el monitoreo en los cambios que sufre dicha célula. Para cuantificar las variaciones de la expresión de cualquier gen se detecta al ARN mensajero. Hasta la fecha, los análisis en la expresión génica en los eucariotes han proporcionado la prueba que la regulación ocurre en el ámbito de la transcripción, el procesamiento del ARN nuclear y la estabilidad del ARNm.

Para el estudio de regiones de ADN que se sospecha que están involucradas en la regulación de la transcripción del ARN se utiliza la unión de dichas secuencias de ADN con genes reportadores (construcción de plásmidos), que se introducen en una célula, y con esta manipulación conocer si estas regiones tienen influencia en la expresión de dicho gen. Esta estrategia, que usa células manipuladas (transfección), ha conducido a la identificación de docenas de amplificadores, silenciadores, promotores, aisladores, etc. Como se observa en la tabla 1 no solo hay una anomalía en la transcripción y en la traducción, sino que estas expansiones de tripletes repetidos también afectan el procesamiento del ARN. Como se discutió anteriormente para entender por qué las expansiones de los tripletes repetidos causan enfermedades, es necesario disectar todas las etapas involucradas como la replicación, el procesamiento del ARN y la traducción. Tomando en cuenta que son enfermedades humanas, el modelo para el estudio de ellas debe ser muy cercano a la realidad. El sistema que se propone para el estudio de la estabilidad del ARNm está basado en la expresión de un gen reportador que contenga en su extremo 3' no traducido a las expansiones de los tripletes repetidos en unas células de origen neuronal humanas las células SH-SY-5Y.

La línea celular SK-N-SH, fue establecida en cultivo celular a partir de un neuroblastoma humano y mantenida *in vitro* por 1 o 2 años. La línea SK-N-SH comprende a dos tipos de células que difieren en su morfología, una célula tipo neuroblástica (N) con propiedades noradrenérgicas y otra célula epitelióide (S) con propiedades de melanocitos (Beidler 1973). Las células SH-SY-5Y son la tercera clona de las células SK-N-SH y son de tipo neuroblásticas (N).

Dentro de las principales características de este tipo de células es que exhiben actividad enzimática de tipo neuronal, utilizan norepinefrina y presentan una o más de las proteínas de los neurofilamentos (vimentina, GFAP) (Ciccarone *et al.*, 1989). Siendo estas células de origen humano y además de tipo neuronal, son un buen sistema para evaluar si las expansiones de los tripletes repetidos causan alguna anomalía.

La familia de genes de las globinas es un buen modelo para el estudio de la expresión diferencial de los genes durante el desarrollo. La α y β -globina son codificadas por un pequeño grupo de genes que son secuencialmente expresados durante el desarrollo. La α y β -globina se expresan en edad adulta y conforman a la hemoglobina de los glóbulos rojos. El gen de la β -globina se encuentra formando parte de un grupo de genes que corresponden a otras globinas y se ha determinado el mapa físico de estos genes por técnicas de biología molecular. También se han realizado estudios acerca del promotor del gen, así como de su estabilidad y se ha observado que este gen cuando se expresa en un sistema heterólogo es muy estable. Desde que se logró clonar el gen de la β -globina se ha utilizado para múltiples investigaciones, entre ellas se encuentran el estudio del fenómeno de corte y empalme (splicing) y la determinación de elementos que varían la estabilidad del ARNm de otros genes. Dentro de este último tenemos como ejemplo, la utilización del gen de la β -globina para determinar secuencias que controlan el decaimiento del ARNm del gen de *c-fos* y las mutaciones mediante las cuales este mensajero es inactivado y como consecuencia degradado (Ann-Bin *et al.*, 1989, 1991 y Nianhua *et al.*, 1997). Debido a su estabilidad y su utilidad en otros estudios el gen de la β -globina es un buen gen reportador para monitorear los cambios que producen las expansiones de tripletes repetidos en la expresión del gen.

Con estos componentes, se propone estudiar la estabilidad del ARNm del gen de la β -globina cuando en su extremo 3' no traducido se inserten las expansiones de los tripletes repetidos y, esta construcción sea transfectada de forma transitoria en las células SH-SY-5Y. La estabilidad del ARNm se seguirá mediante la técnica de Northern blot.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GENERALES

- Establecer un sistema que permita el estudio del efecto de los tripletes repetidos sobre la estabilidad del ARNm.
- Construir secuencias expandidas de trinucleotidos repetidos *in vitro* para su inserción en un vector de expresión que contiene el gen de la β -globina de conejo.
- Construir dos vectores para la producción de sondas de ARN complementarias al ARNm de α - y β -globina respectivamente.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer las condiciones adecuadas de cultivo de las células de neuroblastoma humano SH-SY-5Y.
- Estandarizar la técnica de transfección de las células SH-SY-5Y con los plásmidos pSV α 1 y pBBB.
- Construir a partir del plásmido pSVB10 un vector para la producción de una ribsonda complementaria con el segundo exón del gen de la β -globina de conejo.
- Construir a partir del plásmido pSV α 1 un vector para la producción de una ribsonda complementaria con el tercer exón del gen de la α -globina de humano.
- Realizar las expansiones *in vitro* de las secuencias CCg/ggC, CTg/AgC, TTC/AAg y gAC/TCg.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Plásmidos de trabajo.

Los plásmidos utilizados en este trabajo fueron proporcionados por el Dr. Ann-Bin S. Hwu, del Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts (Ann-Bin S. 1989; 1991). Los plásmidos son los siguientes:

El plásmido pBBB contiene el gen de la β -globina de conejo, expresado por el promotor del oncogen *c-fos* y el gen de resistencia a ampicilina (figura 6).

El plásmido pSVB10 que contiene el gen de la β -globina de conejo expresado por el promotor temprano SV40, los promotores T7 y T3 de las RNA polimerasas y el gen de resistencia a ampicilina (figura 7).

El plásmido pSV α 1 que contiene el gen de la α -globina humana, expresado por el promotor temprano de SV40, los promotores T7 y T3 de las RNA polimerasas y el gen de resistencia a ampicilina (figura 8).

3.2. Cepas bacterianas.

Las cepas de *E.coli* utilizadas en el desarrollo del trabajo fueron proporcionadas por el Dr. Asis K. Das, del Department of Microbiology, University of Connecticut Health Center, Farmington, Connecticut:

1. DH5 α : ϕ 80d *lacZ* Δ M15, *rec A1*, *end A1*, *gyr A96*, *thi-1*, *hsdR17* (r_K^- , m_K^+), *supE44*, *relA1*, *deo R*, Δ (*lacZYA-argF*)U169.
2. BL21: F' *ompT hsdS_B* (r_B^- m_B^-) gal dcm $^-$

3.3. Medios de cultivo

3.3.1. Medio de cultivo para bacterias

Todas las bacterias crecieron y se cultivaron en medio Luria-Bertoni junto con el antibiótico de selección ampicilina. En todos los casos la concentración del antibiótico fue de 50 μ g/mL. La preparación de los medios de cultivo se realizó según la metodología descrita en Sambrook *et al.*, 1989.

3.2. Medio de cultivo para células SH-SY-5Y

Las condiciones adecuadas para el cultivo de la línea celular SH-SY-5Y fueron, medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2.5 µg/mL de fungizona, 0.1 mM de una mezcla de aminoácidos no esenciales, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 1 mM de piruvato de sodio.

3.4. Transformación de bacterias

3.4.1. Nitrógeno líquido (Takahashi *et al.*, 1992)

De un cultivo en medio sólido con incubación no mayor de 16 horas a 37°C se inocularon 5 mL de medio LB y el cultivo se incubó a 37°C con agitación de 200 r.p.m. (Brinkmann OrbiMix 1010). Una vez que la densidad óptica (550 nm) llega a un valor no mayor a 0.4, se mezclaron 10 ng de plásmido con 100 µL del cultivo en un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL.

La mezcla se colocó directamente en nitrógeno líquido durante un minuto. Pasado este tiempo se dejó la mezcla congelada en reposo a temperatura ambiente hasta fundirse y se esperó mínimo 45 min. antes de plaquearse en el medio para la selección de bacterias transformantes.

3.4.2. Cloruro de Calcio

Se realizó una modificación al método descrito en Sambrook *et al.*, 1989. Con una colonia de un cultivo en caja con incubación no mayor de 16 h a 37°C se inocularon 5 mL de medio LB. El cultivo se incubó a 37°C con agitación de 200 r.p.m. (Brinkmann OrbiMix 1010). Se dejó el tiempo necesario para que el cultivo alcanzara una densidad óptica (550nm) no mayor de 0.3. Al alcanzar esta densidad se concentró por centrifugación a 6000 r.p.m. para obtener una densidad óptica de 0.5. A partir de este paso se siguió con la técnica original.

3.5. Manejo de células SH-SY-5Y

Las células fueron donadas por la Dra. Rosa María del Ángel del Departamento de Patología Experimental del CINVESTAV-IPN.

3.5.1. Descongelamiento de células SH-SY5Y (Davis M.J. 1994)

1. Se descongela una ampolla con células que ha sido mantenida en congelación a una temperatura de -172°C , sumergiéndola a baño María a 37°C (la descongelación debe realizarse lo más rápido posible).
2. Una vez descongelada se abre la ampolla y las células se extraen con ayuda de una jeringa desechable.

- El contenido de la jeringa se transfiere a un tubo de centrifuga que contenga 2 mL de medio DMEM con 10% de suero fetal bovino.
- Se homogeneiza suavemente por pipeteo
- Después de 10 minutos se agregan 4 mL del mismo medio, se pipetea suavemente y se centrifuga durante 10 minutos a 2000 r.p.m. en una centrifuga clínica.
- El sobrenadante se desecha, se agregan 4 mL del mismo medio de cultivo y se resuspende el paquete celular por pipeteo.
- 1 mL de las células se distribuyen en cada botella de 75cm² de superficie, se adicionan 11 mL de medio DMEM con 10% de suero fetal bovino. Se homogeneiza por pipeteo.
- Se rotula cada botella con los siguientes datos: Tipo de células, número de pase descongelado y fecha.

5.2. Pase de células SH-SY5Y (Davis M.J. 1994)

- Una vez que el cultivo es confluyente, se elimina el medio de cultivo (por el lado opuesto a la monocapa celular).
- Las células se disgregan del cultivo por pipeteo suave.
- Se homogeneiza.
- Las células se distribuyen en botellas de cultivo a una densidad de 1×10^6 células por botella.
- Se adiciona el medio necesario para completar 12 mL de medio DMEM con 10% de suero fetal bovino.
- Se rotula cada botella.

3.5.3. Congelación de células SH-SY5Y (Davis M.J. 1994)

1. Se desecha el medio de mantenimiento de una botella de cultivo con una monocapa celular.
2. Se adicionan 2 mL de medio de cultivo completo y las células se disgregan por un pipeteo suave.
3. Las células se colocan en un tubo para centrifuga y se centrifugan a 2000 r.p.m. en una centrifuga clínica durante 10 min.
4. Se desecha el medio y se resuspende el paquete celular en aproximadamente 1.8 mL de medio de cultivo completo.
5. Se enfrían a 4°C durante 30 minutos.
6. Se agregan 0.2 mL de dimetilsulfóxido, se mezcla suavemente por inversión y se envasa rápidamente en criotubos.
7. Se rotula cada criotubo adecuadamente
8. Los criotubos se colocan a -70°C por 16 h.
9. Pasado este tiempo se transfieren a -196°C.

3.5.4. Transfección

3.5.4.1. Transfección en monocapa mediada por fosfato de calcio. (Sambrook *et.al.*1989)

1. La solución de transfección se prepara mezclando las siguientes soluciones:

440 μL de ADN (6 μg de plásmido prueba, 14 μg de plásmido acarreador en

0.1X TE)

500 μL de 2X HBS (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM Na_2HPO_4 , 12 mM dextrosa y 50 mM HEPES)

A esta mezcla se adicionan lentamente 62 μL de 2 M CaCl_2 . Se mezcla y se incuba 30 min. a temperatura ambiente.

4. De una monocapa de células se retira el medio de cultivo y se lava dos veces con PBS pH 7.3 (13.7 mM de NaCl, 0.43 mM de K_2HPO_4 y 0.14 mM de KH_2PO_4).

5. Se adiciona 1 mL de la solución de transfección.

6. Se agregan 9 ml de medio DMEM con 10% SFB.

7. Las células se exponen al ADN durante 24 h.

8. Se retira la solución de transfección y se lava dos veces con PBS.

9. Se ensaya la capacidad de transfección.

5.4.2. Transfección en monocapa con Lipofectamina Plus. (Life Technologies, 1998)

1. A 0.75 mL de medio de cultivo se adicionan 4 μL de ADN y 20 μL del reactivo Plus.

2. Se diluyen 30 μL de Lipofectamina en 1.5 mL de DMEM con 0.5% de suero fetal bovino.

3. Las soluciones anteriores se adicionan a una caja con una monocapa de células al 80% de confluencia.

4. Las células se exponen al ADN por 24 h.

5. Pasado este tiempo se elimina el medio y se lava dos veces con PBS.

6. Se adicionan 10 mL de DMEM con 10% de suero fetal bovino y se incuban por 24 h a 37°C y 5% de CO₂.
7. Se ensaya la capacidad de transfección.

3.5.4.3. Transfección mediada por fosfato de calcio en suspensión. (Weihung Song. 1995)

1. La solución de transfección se prepara como se indicó anteriormente en la técnica de transfección en monocapa mediada por fosfato de calcio.
2. Las células se cosechan y se ajustan a una densidad de 4 X 10⁶ células/mL.
3. Se mezcla 1:1 la solución de transfección con la suspensión celular
4. Se incuba la mezcla durante 30 min. a temperatura ambiente.
5. En cada placa se coloca 1 mL de la mezcla y se adicionan 9 mL de medio DMEM con 10% de suero fetal bovino.
6. Se Incuba a 37°C y 5% CO₂ por 24 h.
7. Las células se cosechan.
8. Se ensaya la capacidad de transfección.

3.5.4.4. Ensayo de la capacidad de transfección

La capacidad de transfección se realizó determinando la expresión transitoria de la enzima β -galactosidasa. Las células fueron transfectadas con un plásmido que contiene este gen, bajo el control del promotor para eucariotes del virus de sarcoma de Rous (pRSV- β -gal). La técnica que se siguió es la descrita en Sambrook *et.al.*, 1989.

6. Manejo de oligonucleótidos

Para la construcción de los tripletes repetidos se usaron los siguientes oligonucleótidos sintetizados en la Unidad de Ácidos Nucléicos del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN por la M en C. Guadalupe Aguilar G:

Oligonucleótidos de 15 residuos sin el sitio Bgl II:

	Tm (°C)	Número de registro
' CTg CTg CTg CTg CTg 3'	43.0	944
' AgC AgC AgC AgC AgC 3'	44.9	952
' TTC TTC TTC TTC TTC 3'	24.3	887
' AAg AAg AAg AAg AAg 3'	23.9	948
' CCg CCg CCg CCg CCg 3'	55.9	953
' ggC ggC ggC ggC ggC 3'	68.5	945
' gAC gAC gAC gAC gAC 3'	40.3	949
' TCg TCg TCg TCg TCg 3'	45.9	950

Oligonucleótidos de 22 residuos con el sitio Bgl II:

	Tm (°C)	Número de registro
5' ggg <u>AAg ATCT</u> CTg CTg CTg CTg 3'	64.3	994
5' ggg <u>AAg ATCT</u> AgC AgC AgC AgC 3'	63.4	993
5' ggg <u>AAg ATCT</u> TTC TTC TTC TTC 3'	52.5	992
5' ggg <u>AAg ATCT</u> AAg AAg AAg AAg 3'	50.7	991
5' ggg <u>AAg ATCT</u> CCg CCg CCg CCg 3'	79.0	987
5' ggg <u>AAg ATCT</u> ggC ggC ggC ggC 3'	79.1	988
5' ggg <u>AAg ATCT</u> gAC gAC gAC gAC 3'	63.8	990
5' ggg <u>AAg ATCT</u> TCg TCg TCg TCg 3'	65.6	989

3.6.1. Alineamiento de oligonucleótidos

1. La reacción de alineamiento se realizó en un volumen total de 53 μL con 14 μM de cada oligonucleótido y 3 μL de SSC 20X (3M NaCl, y 0.3 M de citrato de sodio pH 7.0).
2. Se mezcla.
3. Se incuba por 15 min. a 100°C en un termobloque (Multi-blok heater, Lab-Line).
4. Pasado este tiempo se apaga el termobloque y se deja que llegue a temperatura ambiente.
5. La reacción se guarda a -20°C.
6. El alineamiento se comprobó por el fraccionamiento en un gel de agarosa al 1%

Se purifica por fenol, se precipita y se resuspende en TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM EDTA).

6.2. Fosforilación y ligación de oligonucleótidos

La reacción de fosforilación se realizó en 40 μ L de volumen total de buffer de ligación 1X (Polietilen glicol-8000 8% (p/v); 30 mM Tris HCl; 10 mM $MgCl_2$ y 10 mM DTT), 1 mM ATP, 106.27 mM ADN de doble cadena y 10 unidades de T4 polinucleótido cinasa (Boehringer).

1. Se mezcla.

2. Se incuba por 2 h a 37°C en un termobloque.

3. Terminado el tiempo la reacción se pasa a hielo.

4. Se adicionan 6 unidades de T4 DNA ligasa (Boehringer) a los 40 μ L de la reacción de fosforilación.

5. Se incuba durante 4 h a 37°C.

6. La ligación se comprobó por el fraccionamiento en un gel de agarosa al 4%.

7. Se purifica con fenol, se precipita con etanol y se resuspende en TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM EDTA).

8. La ligación secundaria se realizó en un volumen total de 46 μ L de buffer de ligación 1X (Polietilen glicol-8000 8% (p/v); 30 mM Tris HCl; 10 mM $MgCl_2$ y 10 mM DTT), 1 mM ATP, 92.4 mM ADN de doble cadena y 6 unidades de T4 DNA ligasa (Boehringer).

9. La ligación se comprobó por el fraccionamiento en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4%.

11. Se purifica con fenol, se precipita con etanol y se resuspende en TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM EDTA).
12. La ligación terciaria se realizó en un volumen de 46 μ L de buffer de ligación 1X (Polietilen glicol-8000 8% (p/v); 30 mM Tris HCl; 10 mM $MgCl_2$ y 10 mM DTT), con 1 mM ATP, 92.4 mM ADN de doble cadena y 6 unidades de T4 DNA ligasa (Boehringer).
13. La ligación se comprobó por el fraccionamiento en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4%.
14. Se purifica con fenol, se precipita con etanol y se resuspende en TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM EDTA).

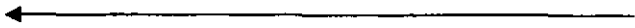
3.6.3. Amplificación y expansión de tripletes repetidos por PCR

Las reacciones de PCR se realizaron bajo las siguientes condiciones generales. Se realizaron en un volumen final de 100 μ L de buffer para PCR 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl), 0.2 mM de cada nucleótido (dATP, dTTP, dGTP y dCTP), 0.5 μ M de primer correspondiente a cada secuencia, 1 μ g de ADN molde y 2.5 unidades de Taq DNA polimerasa recombinante (Life Technologies).

Para las reacciones de PCR se utilizó el siguiente programa, tomando la temperatura de alineamiento (T_m) correspondiente a cada oligonucleótido

Pre calentamiento de platina 95°C por 6 min.

95°C por 1 min.



35 veces

Desnaturalización 95°C por 30 s.

Alineamiento a la temperatura indicada para cada oligo por 30 s.

Alargamiento 72°C por 1 min.

72°C por 15 min.

4°C indefinido

7. Extracción de ADN plasmídico

Para preparar a los plásmidos se transformaron bacterias competentes DH5 α por nitrógeno líquido (Takahashi Rei, 1992) y las bacterias portadoras del plásmido fueron seleccionadas y purificadas en LB ampicilina. Los métodos utilizados para la extracción de los plásmidos fueron los siguientes:

7.1. Extracción a mediana escala por lisis alcalina y lisozima.

500 mL de medio LB ampicilina se inocularon con las colonias de dos cajas de bacterias de menos de 16 h de incubación. El medio se incubó por 4 h a 37°C con agitación a 200 r.p.m. (Brinkmann OrbiMix 1010). Las bacterias se recuperaron por centrifugación en una centrífuga refrigerada Eppendorf modelo 5804R a 6000 r.p.m. por 4 min. a 4°C.

Se realizó la extracción de plásmido por el método descrito en Sambrook *et al*, 1989.

El ADN obtenido se resuspendió en 2 mL de TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM EDTA).

3.7.2. Extracción a mediana escala por el Plasmid Maxi Kit de Qiagen.

500 mL de medio LB ampicilina se inocularon con las colonias de dos cajas de bacterias de menos de 16 h de incubación. El medio se incubó por 4 h a 37°C con agitación de 200 r.p.m. Las bacterias se recuperaron por centrifugación en una centrifuga refrigerada Eppendorf modelo 5804R a 6000 r.p.m. por 4 min. a 4°C. Se realizó la extracción de plásmido por el Qiagen Plasmid Maxi Kit (Tip 500). El ADN obtenido se resuspendió en 1 mL de TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM EDTA).

3.7.3. Mini extracción de plásmido por el Qiaprep Spin Miniprep Kit de Qiagen.

5 mL de medio LB ampicilina se inocularon con las colonias de media caja de bacterias de menos de 16 h de incubación. El medio se incubó por 3 h a 37°C con agitación de 200 r.p.m. Las bacterias se recuperaron por centrifugación en una centrifuga refrigerada Eppendorf modelo 5804R a 6000 r.p.m. por 4 min. a 4°C. Se realizó la extracción de plásmido por el Qiaprep Spin Miniprep Kit de Qiagen. El ADN obtenido se resuspendió en 50 µL de TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM EDTA).

3.8. Manejo de ADN

3.8.1. Reacciones de Restricción

Las reacciones de restricción se realizaron bajo las siguientes condiciones generales, 1 unidad enzimática por 1 μg de ADN, buffer requerido por cada enzima 1X en un volumen total de 20 μL . Los tubos de las reacciones se incubaron por 30 min. a la temperatura correspondiente para cada enzima en un termobloque (Multi-Block Heater de Lab-Line). En la tabla 2 se muestran las enzimas utilizadas así como la composición de los buffer de reacción.

3.8.2. Reacción Klenow

La reacción se realizó en un volumen total de 20 μL de buffer para Klenow 1X (50 mM de Tris-HCl pH 7.5, 10 mM de MgCl_2 y 1 mM de DTT), con 1 unidad de la enzima Klenow (Boehringer) por 1 μg de ADN y 25 μM de la mezcla de nucleótidos (dATP, dTTP, dGTP y dCTP). La reacción se incubó en un termobloque (Multi-Block Heater de Lab-Line) por 30 min. a 37°C.

3.8.3. Reacciones de ligación

Las ligaciones se realizaron en un volumen total de 20 μL de buffer de ligación 1X (polietilenglicol 8000 8% (p/v), 30 mM de Tris-HCl, 10 mM de MgCl_2 y 10 mM de DTT), 1 unidad de T4 DNA ligasa (Boehringer) por 1 μg de ADN y 1.7 mM de ATP. Las reacciones fueron incubadas por 16 h a temperatura ambiente (extremos romos) o a 4°C (extremos cohesivos).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Construcción de los plásmidos pSV α 1, pBBB y pSVB10 *in silico*

Debido a que se requería manejar los plásmidos y no se contaba con un mapa de ellos, se procedió a la simulación de la construcción de los plásmidos pBBB (figura 6), pSVB10 (figura 7) y pSV α 1 (figura 8). La construcción fue simulada en el programa Vector NTI v 5.03 de Informax Inc. siguiendo las indicaciones que se encuentran en las referencias del Dr. Ann-Bin Shyu (Ann-Bin S. 1989; 1991). Las secuencias utilizadas para la simulación de esta construcción fueron tomadas de la base de datos Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/nucleotide.html>). Las secuencias obtenidas de esta base de datos fueron:

1. Gen de la alfa-1 globina humana (HSAGL4). Número de acceso: V00491, NID g28552.
2. Gen de la β -globina de conejo (*O. cuniculus*). Número de acceso: K03256 M12603.
3. Genoma completo de SV 40. Número de acceso: J02400 J02402 J02403 J02406 J02407 J02408 J02409 J02410 J04139.
4. Plásmido pT7/T3- α -18. Secuencia obtenida de Servicios técnicos de Life Technologies: página web: www.lifetech.com Información técnica.
5. Plásmido pUC 12. Número de acceso: VB0023.
6. Proto-oncogen fos (c-fos) humano. Número de acceso: K00650 M16287

1.2. Transfección de las células SH-SY-5Y

El primer ensayo fue la transfección de la línea celular SH-SY-5Y. Se optimizó la técnica de transfección y se seleccionó el método con el cual la variación en la capacidad de transfección fue menor. Para elegir la mejor técnica se probaron los ensayos de transfección en monocapa mediada por fosfato de calcio, en monocapa mediada por liposomas (LipofectaminaPlus) y en suspensión mediada por fosfato de calcio. Estos ensayos de transfección se realizaron utilizando al plásmido pRSV- β -gal que contiene la secuencia de la enzima β -galactosidasa dirigida por el promotor del virus de sarcoma de Rous. La capacidad de transfección se midió monitoreando la actividad de la enzima β -galactosidasa cuando es expresada transitoriamente en las células SH-SY-5Y. La actividad específica de la enzima se midió espectrofotométricamente. En la gráfica 5 se presenta la capacidad de transfección para cada ensayo. El método estándar es la transfección en monocapa mediada por fosfato de calcio, que requiere la precipitación y la aplicación de este precipitado a cada placa que contiene la monocapa celular. Cuando se utiliza un gran número de placas la variación en la capacidad de transfección es muy alta, dificultando el desarrollo del experimento. Es por esta razón que se eligió la transfección en suspensión mediada por fosfato de calcio como el método de elección, debido a que al incubar el precipitado de ADN con la suspensión celular, y dividir esta mezcla en cada una de las placas, cada placa es idéntica en términos de la capacidad de transfección (tabla y 3 figura 5).

Con estos experimentos se logró establecer un protocolo adecuado para el cultivo de las células SH-SY-5Y, así como una técnica de transfección para futuros experimentos.

4.3. Expansión de los tripletes repetidos

La expansión de los tripletes repetidos se logró a través de los siguientes procedimientos.

4.3.1. Alineamiento de oligonucleótidos

Para obtener ADN de doble cadena los oligonucleótidos se alinearon con su respectiva secuencia complementaria, obteniendo los siguientes pares de secuencias: TTC/AAG, CCg/ggC, gAC/TCg y CTg/AgC. El alineamiento de los oligonucleótidos de una sola cadena se comprobó mediante el fraccionamiento en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4% (figura 9, 10 y 11). El alineamiento se observa por el retardamiento en el corrimiento de los oligonucleótidos que sí se alinearon, comparándolos con los oligonucleótidos de una sola cadena. Una vez alineados los oligonucleótidos, el ADN de doble cadena se purificó mediante un gel preparativo de agarosa al 2%. En el alineamiento del par de oligonucleótidos TTC y AAG solo se observa el ADN de doble cadena (figura 11 carril 2), los oligonucleótidos de cadena sencilla no fijan el bromuro de etidio y por lo tanto no se logran observar en el gel.

4.3.2. Fosforilación y ligación de ADN de doble cadena

Ya comprobada la existencia del ADN de doble cadena se continuó con la fosforilación y ligación de éstos.

Primero se realizó la fosforilación y la ligación con las condiciones indicadas en la hoja técnica de cada enzima. La ligación del ADN de doble cadena se comprobó por fraccionamiento en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4% (figura 12). Como se observa, bajo estas condiciones la eficiencia de la ligación es un poco deficiente, por lo que se decidió probar nuevas condiciones para la reacción de ligación.

El triplete TTC/AAg fue utilizado para optimizar la reacción de ligación. El primer parámetro que se varió fue la temperatura de ligación, probándose las siguientes temperaturas: 16°C, 37°C y -15°C. La eficiencia de la ligación a estas temperaturas se determinó por fraccionamiento en dos geles de agarosa de bajo punto de fusión. Un gel fue al 2% (figura 13A) y el otro al 4% (figura 13B). Con estos resultados se determinó que la mejor temperatura es la de 37°C (carril 3 en ambas figuras) ya que se observan productos de ligación con un mayor peso molecular formando bandas definidas.

El siguiente parámetro que se varió en la ligación fue la cantidad del triplete manejándose las siguientes concentraciones 46.17 μM , 92.4 μM , 231.02 μM y 355.77 μM . Una vez más se comprobó la eficiencia de la ligación por fraccionamiento en dos geles de agarosa de bajo punto de fusión uno al 2% (figura 14A) y otro al 4% (figura 14B). Se aprecia que a la concentración de 92.4 μM del triplete (carril 3 en ambos geles) hay una mayor cantidad de productos de ligación con elevado peso molecular al igual que en la ligación anterior. Con estas dos condiciones, 37°C y 92.4 μM de ADN de doble cadena fosforilado y ligado se realizó una segunda ligación (figura 15).

Esta segunda ligación se hizo con el fin de aumentar el peso molecular de los productos. Como se esperaba los productos de esta ligación secundaria fueron de mayor peso molecular en comparación con los productos de la primera ligación. Al obtener estos productos con un mayor peso molecular por las dos ligaciones consecutivas, se decidió hacer una tercera ligación (figura 16 carriles 6 y 7) tomando el triplete fosforilado y ligado dos veces. Como se ve el aumento en el peso molecular de los productos de la tercera ligación es evidente. Una vez optimizadas las condiciones para la ligación del triplete TTC/AAg se realizó el mismo procedimiento con cada uno de los tripletes faltantes, CCG/ggC (figura 16A carriles 4 y 5), gAC/TCg (figura 16A carriles 2 y 3) y CTg/AgC (figura 16B carriles 2 y 3).

4.3.3. Expansión y amplificación de tripletes repetidos por PCR

Con el fin de expandir los tripletes a un mayor peso molecular, 1 µg de los productos de peso molecular aproximado a 500 bp fueron amplificados por la técnica de PCR. En el primer experimento se varió la concentración de cloruro de magnesio presente en la reacción tomando el intervalo de 1.5 a 9.0 mM para todas las secuencias. Para estas reacciones se utilizaron como primers a los oligonucleótidos que no contenían el sitio Bgl II en su secuencia (figura 17 y 18). Al analizar el fraccionamiento en el gel de agarosa al 1% la mejor expansión de los cuatro tripletes coincide en la concentración de 9.0 mM de cloruro de magnesio (carril 7 en todos los geles).

Los productos de PCR obtenidos en las reacciones donde la concentración de cloruro de magnesio era de 9.0 mM se purificaron, se cuantificaron espectrofotométricamente y se corrieron en un gel de agarosa al 1% para verificar el peso molecular aproximado de estas expansiones (figura 19). Como se observa en la figura la expansión del triplete CCg/ggC (carril 2) presenta productos de bajo peso molecular y una ligera expansión. En comparación los otros tres repetidos TTC/AAg (carril 3), CTg/AgC (carril 4) y gAC/Tg (carril 5) muestran expansiones que van de 702 bp hasta 8000 bp de peso molecular.

3.4. Expansión y amplificación de tripletes repetidos con un sitio de restricción en sus extremos

Para facilitar la clonación de las expansiones de los tripletes repetidos en un vector de expresión, se introdujo en su secuencia un sitio de restricción correspondiente a la enzima Bgl II. Nuevamente se utilizó la técnica de PCR como la herramienta para lograr este fin. El procedimiento que se siguió se describe a continuación. Las expansiones de los tripletes repetidos producidas en la sección anterior se utilizaron como molde para hacer nuevas reacciones de PCR. Para introducir el sitio de restricción se realizó la amplificación y expansión de los tripletes con los primers que contienen en su secuencia el sitio Bgl II. La expansión de los tripletes repetidos con esta nueva secuencia fue optimizada. Las condiciones de las reacciones de PCR para cada triplete se describen a continuación.

Para el triplete TTC/AAg primero se varió la concentración de cloruro de magnesio de 7.5 a 13.5 mM. Utilizando como primers a los oligonucleótidos con el sitio Bgl II y como molde el ADN de las reacciones de PCR a 9.0 mM de cloruro de magnesio producido en la sección anterior (figura 20). En la figura se observa que a concentraciones de 12.0 y 13.5 mM de cloruro de magnesio (carril 5 y 6 respectivamente) las expansiones son de muy elevado peso molecular, por lo que se decidió probar concentraciones menores de cloruro de magnesio. Las concentraciones fueron: 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 y 10.0 mM, se utilizó como ADN molde a los productos de PCR de las reacciones anteriores que ya tienen el sitio Bgl II (figura 21). La mejor expansión se obtuvo entre las concentraciones de 4.0 y 6.0 mM de cloruro de magnesio (figura 21 carriles 3 y 4 respectivamente). Para tratar de precisar la concentración a la cual se obtiene la mejor expansión, se probaron las concentraciones de 4.0, 5.0, 6.0 y 7.0 mM de cloruro de magnesio con el mismo molde (figura 22). En esta figura la expansión de tripletes repetidos es evidente en las concentraciones de 4.0 y 5.0 mM de cloruro de magnesio (carriles 2 y 3 respectivamente). Tomando en cuenta la cantidad de productos de bajo peso molecular que se producen a la concentración de 4.0 mM se exploró ahora el intervalo de 5.0 mM. Se probaron las siguientes concentraciones: 5.0, 5.25, 5.5, 5.75 y 6.0 mM (figura 23). De aquí se tomó la decisión de usar la concentración de 5.5 mM de cloruro de magnesio, debido a que las expansiones a esta concentración dan una cantidad pequeña de productos de bajo peso molecular. Con estas condiciones se realizó un último PCR para validar el método (figura 24).

Para el triplete CCg/ggC se probaron concentraciones de 7.5 a 13.5 mM de cloruro de magnesio. Para estas reacciones se ocuparon como primers a los oligonucleótidos que contienen el sitio Bgl II y como ADN molde el producido en la sección anterior (figura 25). En esta figura no se observa la expansión del triplete, por esta causa se amplía el intervalo de concentración del cloruro de magnesio. Se intentó con concentraciones de 9.5 a 18.5 mM ocupando como molde el ADN de las reacciones anteriores, que ya contienen el sitio Bgl II (figura 26). En este intervalo de concentración se observa que en todos hay una expansión. Sin embargo, la mejor expansión de este triplete se dio a la concentración de 9.5 mM (carril 3). Con esta concentración se realizó un último PCR para validar el método (figura 27).

Para el triplete gAC/TCg se realizó el PCR a concentraciones de 7.0 a 19.0 mM de cloruro de magnesio. Como molde se utilizó el ADN generado en la sección anterior y como primers a los oligonucleótidos con el sitio Bgl II (figura 28). En esta figura se observa que a 9.5 mM se obtiene la mejor expansión del triplete (carril 3) con poca producción de ADN de bajo peso molecular. Esta expansión es comparable con las obtenidas con los dos triplete anteriores, una moderada expansión con baja producción de fragmentos de bajo peso molecular. Esta concentración fue elegida como la óptima y por último se realizó un PCR bajo esta condición para validar el método (figura 29).

Para el triplete CTg/AgC primero se probaron concentraciones de 7.5 a 13.5 mM de cloruro de magnesio, utilizando como primers a los oligonucleótidos que contienen el sitio Bgl II y como ADN molde el generado en la sección anterior (figura 30).

Como la expansión no es del todo eficiente, se amplió el intervalo de la concentración de cloruro de magnesio. Se probaron ahora las concentraciones de 1.5 a 13.5 mM, utilizando como ADN molde las expansiones de las reacciones anteriores que ya contienen el sitio Bgl II (figura 31). Esta vez si se logró obtener una mejor expansión con las concentraciones de 10.5 y 13.5 mM de cloruro de magnesio (carriles 5 y 6 respectivamente). Después de este resultado se probó el intervalo de concentraciones entre 8.5 y 13.5 mM (figura 32). Se comprobó que la mejor expansión del triplete es a la concentración de 10.5 mM de cloruro de magnesio (carril 4). Tomando esta concentración como la óptima, se realizó un último PCR para comprobar lo anterior (figura 33).

4.3.5. Restricción de las expansiones de tripletes repetidos con la enzima Bgl II y la eliminación de los tripletes repetidos de bajo peso molecular producidos por la restricción

Una vez amplificadas los tripletes repetidos e incluidos los sitios Bgl II se restringieron con la enzima Bgl II (figura 34). La restricción con esta enzima produce fragmentos de bajo peso molecular que podrían interferir con la clonación en el vector de expresión, debido a esto los fragmentos fueron eliminados con el kit Quantum Prep Plasmid Midiprep de BIO-RAD. La comprobación de la eliminación de los productos de bajo peso molecular se realizó por el fraccionamiento en un gel de agarosa al 1% (figura 35). Comparando las dos figuras 34 y 35 se observa que la eliminación de estos productos de bajo peso molecular es realmente eficiente, quedando de esta forma solo las expansiones de los tripletes repetidos de alto peso molecular.

Hasta aquí, las técnicas para generar las expansiones de los tripletes repetidos se encuentran optimizadas y a su vez las expansiones de los tripletes están listas para su clonación en los vectores de expresión.

4. Construcción de vectores para la producción de ribosondas

Las sondas para el monitoreo de la expresión de un gen en particular son una herramienta muy importante. Por lo que para tener ribosondas complementarias con la α y la β -globina que son los genes utilizados en este sistema se generaron dos plásmidos. Un plásmido que contenga una secuencia complementaria a la α -globina que pueda ser transcrita por la enzima T7 RNA polimerasa y otro plásmido con la secuencia complementaria a una parte del gen de la β -globina. El procedimiento se detalla a continuación.

4.1. Construcción del plásmido pT7T3- β -globina

La construcción del plásmido pT7T3- β -globina se realizó en dos pasos. Primero se generó un plásmido intermediario (pT7T3- β -intermediario) y a partir de éste se construyó el plásmido final. Para obtener el plásmido intermediario se eliminó un fragmento Bam HI-Sma I de 1170 bp del plásmido pSVB10 (figura 36 carril 2).

Posterior a esto, el fragmento de 4047 bp se purificó mediante un gel preparativo de agarosa al 1%. El sitio Bam HI se relleno con la enzima Klenow y se recircularizó con la enzima T4 DNA ligasa. Con esta mezcla de reacción se transformaron bacterias DH5 α competentes por calcio. Las bacterias portadoras del plásmido se seleccionaron y se purificaron sembrándose en medio LB ampicilina. Se realizó la extracción del plásmido por el método de Qiagen (Qiaprep Spin Miniprep Kit). Para comprobar la existencia del plásmido intermediario pT7T3- β -intermediario se restringió con las enzimas Hind III, Sst I y Nco I (figura 37).

Ya obtenido el plásmido intermediario, se corto con la enzima Nco I para eliminar un fragmento Nco I-Nco I de 952 bp (figura 37B carril 4). El fragmento Nco I-Nco I de 3099 bp se recircularizó con la enzima T4 DNA ligasa. Con esta mezcla de reacción se transformaron bacterias DH5 α competentes por calcio. Las bacterias portadoras del plásmido se seleccionaron y se purificaron sembrándose en medio LB ampicilina. Se realizó la extracción del plásmido por el método de Qiagen (Qiaprep Spin Miniprep Kit). En la figura 38 se muestran los tres plásmidos pSVB10, pT7T3- β -intermediario y el pT7T3- β -globina que se restringieron con las enzimas Hind III y Sst I así como el mapa del plásmido.

4.4.2. Construcción del plásmido pT7T3- α -globina

La construcción del plásmido pT7T3- α -globina también se realizó en dos pasos, primero el plásmido pSV α 1 se restringió con la enzima Hind III para eliminar un fragmento Hind III-Hind III de 1312 bp (figura 39B carril 2 primer gel).

El fragmento de 3378 bp se recircularizó con la enzima T4 DNA ligasa. Se transformaron bacterias BL21 competentes por calcio con esta mezcla de reacción. En este punto, se utilizó la cepa BL21 debido a que la enzima Msc I no puede restringir a un ADN metilado. La cepa BL21 carece de la función de metilación de tipo dcm. Las bacterias que contenían el plásmido se seleccionaron y se purificaron sembrándose en LB ampicilina. El plásmido se extrajo por el método de Qiagen (Qiaprep Spin Miniprep Kit). Para comprobar la existencia del plásmido intermediario pT7T3- α -intermediario se restringió con Hind III y se comprobó el peso molecular (figura 39B segundo gel).

Habiéndose comprobado la existencia del plásmido intermediario el siguiente paso fue eliminar un fragmento Msc I-Sma I de 206 bp (figura 40 carril 2), para esto primero se cortó con la enzima Msc I (carril 3). Se comprobó la restricción por fraccionamiento en un gel de agarosa al 1% y después se cortó con la enzima Sma I. El fragmento Msc I-Sma I de 172 bp se recircularizó con la enzima T4 DNA ligasa. Se transformaron bacterias DH5 α competentes por calcio con esta mezcla de reacción y las bacterias que contenían el plásmido se seleccionaron y se purificaron sembrándose en LB ampicilina. El plásmido se extrajo por el método de Qiagen (Qiaprep Spin Miniprep Kit). Para comprobar la existencia del plásmido final pT7T3- α -globina se restringió junto con los plasmidos pSV α 1 y pT7T3- α -intermediario con las enzimas Hind III y Sst I (figura 41).

5. TABLAS Y FIGURAS

Tipo	Enfermedad	Repetido	Largo del repetido	Localización del repetido	Resultado de la mutación
I	Atrofia espino y bulbomuscular (SBMA)	CAG	40-62	ORF	Proteínas mutantes conteniendo poliglutaminas
	Enfermedad de Huntigton (HD)	CAG	36-121	ORF	
	Ataxia espinocerebral tipo 3 (MJD SCA3)	CAG	68-79	ORF	
	Ataxia espinocerebral tipo 1 (SCA 1)	CAG	41-81	ORF	
	Ataxia espinocerebral tipo 2 (SCA 2)	CAG	35-59	ORF	
	Ataxia espinocerebral tipo 6 (SCA 6)	CAG	21-27	ORF	
II	Síndrome del X frágil (FraX)	CGG	60-2000	5' UTR	Desorden en el metabolismo de ARN (?). Ausencia del gen de la proteína FMRP-1.
	Distrofia miotónica (DM)	CTG	50-2000	3' UTR	Desorden en el procesamiento del ARN.
	Ataxia de Friedrich (FRDA)	GAA	200-800	Intrón	Producción alterada de ARNm. Replicación alterada.

Tabla 1. Características generales de las enfermedades asociadas a la expansión de los tripletes repetidos.

Enzima	Composición 10X	Temperatura de reacción (°C)	Unidades/ μ L	Nombre comercial
Bam HI	50 mM Tris HCl pH 8.0, 5 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl.	37	10	React 3
Bgl II	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl	37	10	React 3
Hind III	50 mM Tris HCl pH 8.0, 10 mM MgCl ₂ , 50 mM NaCl	37	10	React 2
Msc I	20 mM Tris HCl pH 7.4, 5 mM MgCl ₂ , 50 mM KCl.	37	5	React 4
Nco I	50 mM Tris HCl pH 8.0, 5 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl.	37	10	React 3
Sma I	20 mM Tris HCl pH 7.4, 5 mM MgCl ₂ , 50 mM KCl.	30	10	React 4
Sst I	50 mM Tris HCl pH 8.0, 10 mM MgCl ₂ , 50 mM NaCl	37	10	React 2

Tabla 2. Enzimas utilizadas en la experimentación. Todas son de la compañía de Life Technologies.

Método	A _{420 nm}	C.V. (%)
Transfección en monocapa mediada por calcio	0.127	13.32
	0.100	
	0.132	
	0.137	
Transfección en suspensión mediada por calcio	0.044	1.81
	0.046	
	0.045	
	0.045	
LipofectaminaPlus	0.050	9.83
	0.045	
	0.042	
	0.040	

Tabla 3. Capacidad de transfección por los diferentes métodos empleados. Mediciones de la actividad de β -galactosidasa a una A_{420 nm} C.V.= coeficiente de variación [C.V.= (desviación estándar/promedio)X100].

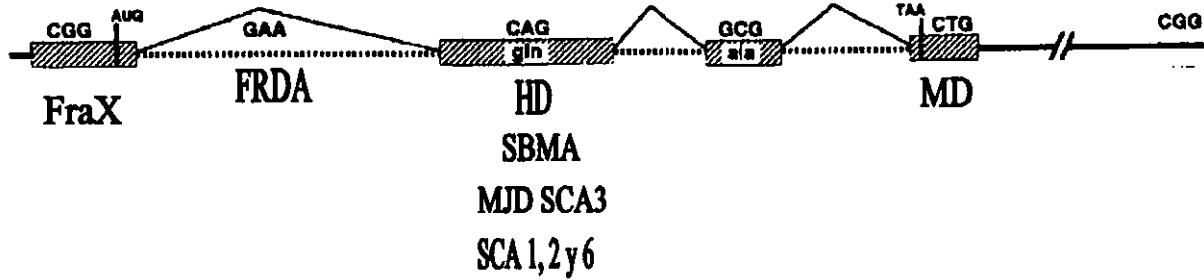


Figura 1. Diagrama esquemático de la posición relativa de la expansión de los Triplettes repetidos en un gen. Exones cajas, intrones líneas. (Adaptada de Mitas M. 1997).

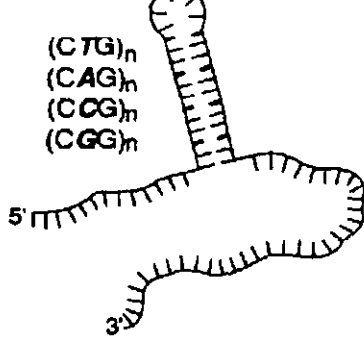
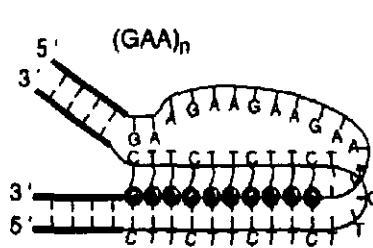
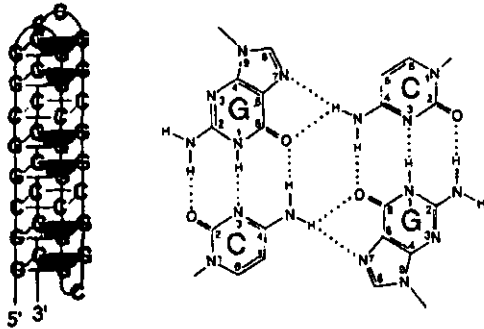
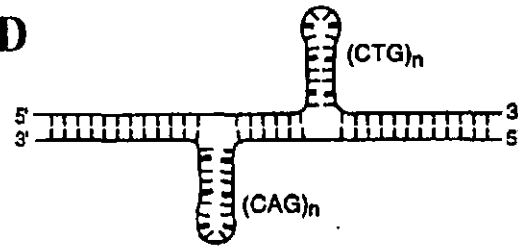
A**B****C****D**

Figura 2. Estructuras de ADN relacionadas con los triplete repetidos. A. Estructura de tallo burbuja. B. Cadena triple de ADN (triplex). C. Cadena cuádruple de ADN (tetraplex) izquierda y derecha enlace tipo Hoogsteen formado por citosinas y guaninas. D. Deslizamiento de cadenas de ADN cuando se forman estructuras de tallo burbuja. (C, tomada de Mitas M. 1997; A, B y D tomada de Sinden R. 1999).

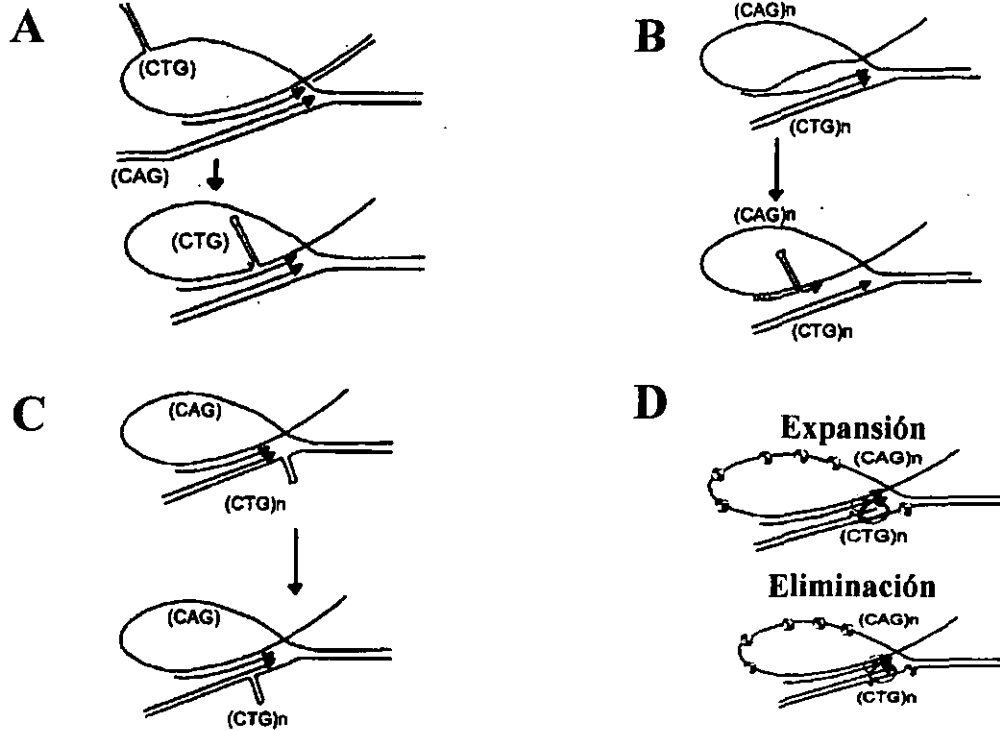


Figura 3. Modelos para la inestabilidad genética de los tripletes repetidos. A. Formación de un tallo burbuja por el triplete CTG en la cadena retardada, la región que se encuentra formando el tallo es omitida por la DNA polimerasa. B. Cuando en la cadena retardada se forma un tallo burbuja con el triplete CAG la posición del primer cambia ocurriendo así la expansión. C. La formación de un tallo burbuja por el repetido CTG en la cadena líder conduce a una eliminación. D. El mal alineamiento del primer y el templado puede originar la eliminación o la expansión de solo tres pares de bases. (Tomadas de Sinden R. 1999).

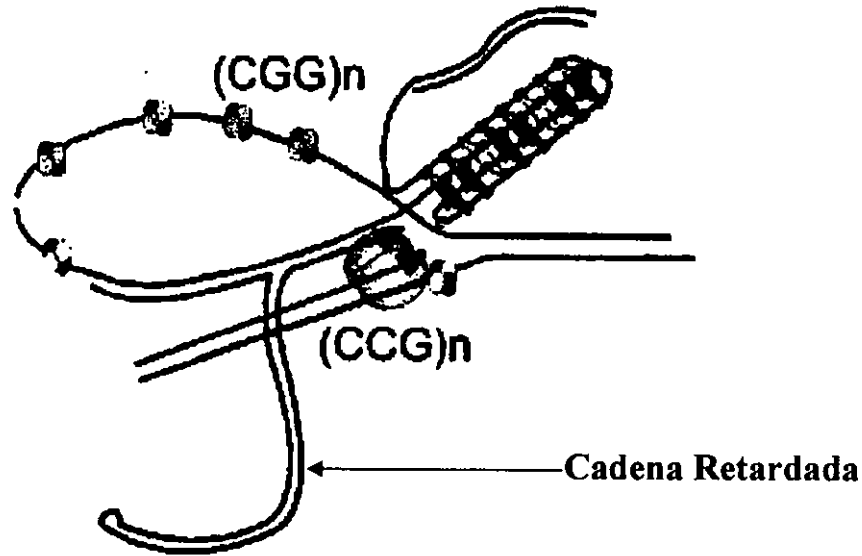


Figura 4. Modelo para la expansión de los triplete repetidos. Una estructura de tipo tetraplex puede formarse fácilmente en el templado de ADN. Esta estructura puede ser un bloqueo para la acción de la DNA polimerasa, promoviendo la síntesis reiterativa de la cadena retardada. (Tomada de Sinden R. 1999).

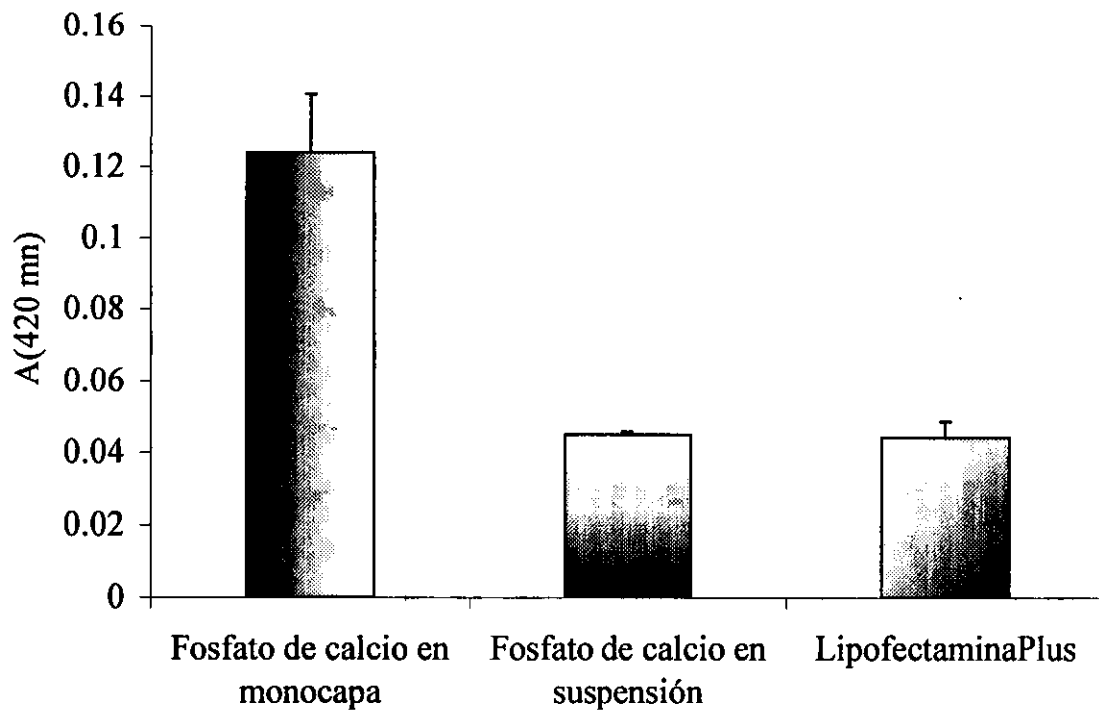


Figura 5. Transfección de las células SH-SY-5Y con los diferentes métodos. Los valores son los promedios de cuatro mediciones +/- desviación estándar.

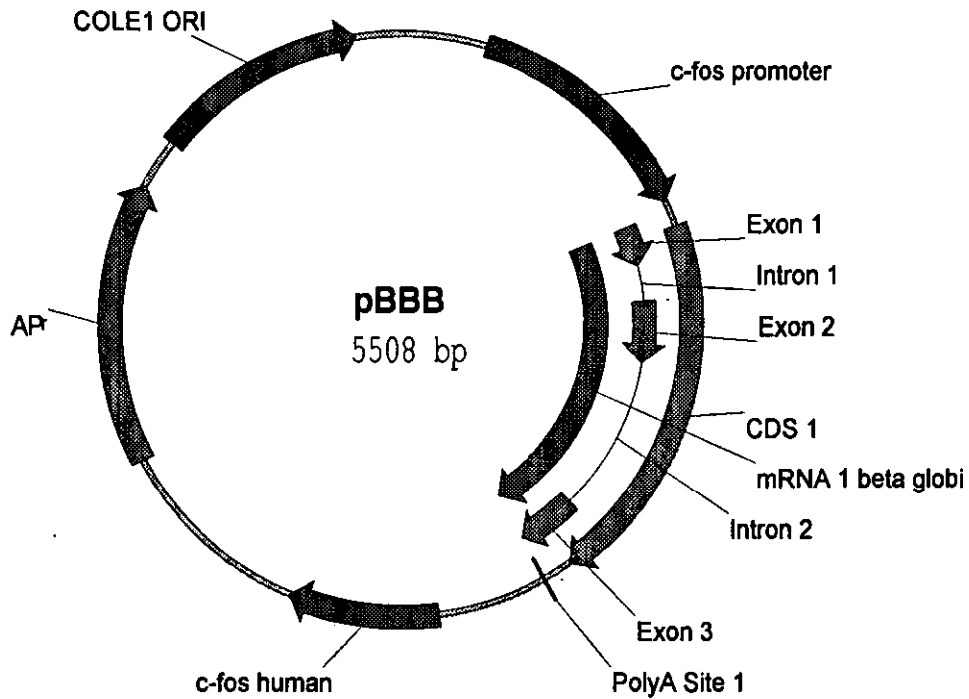


Figura 6. Plásmido pBBB.

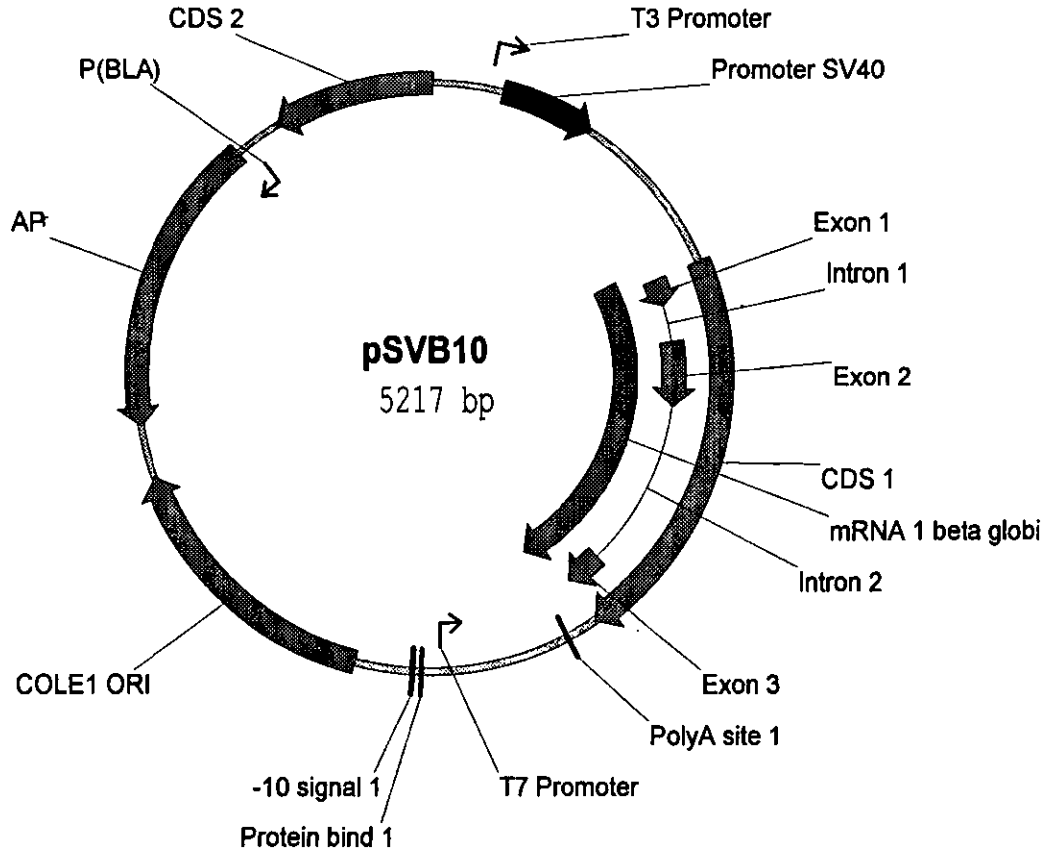


Figura 7. Plásmido pSVB10

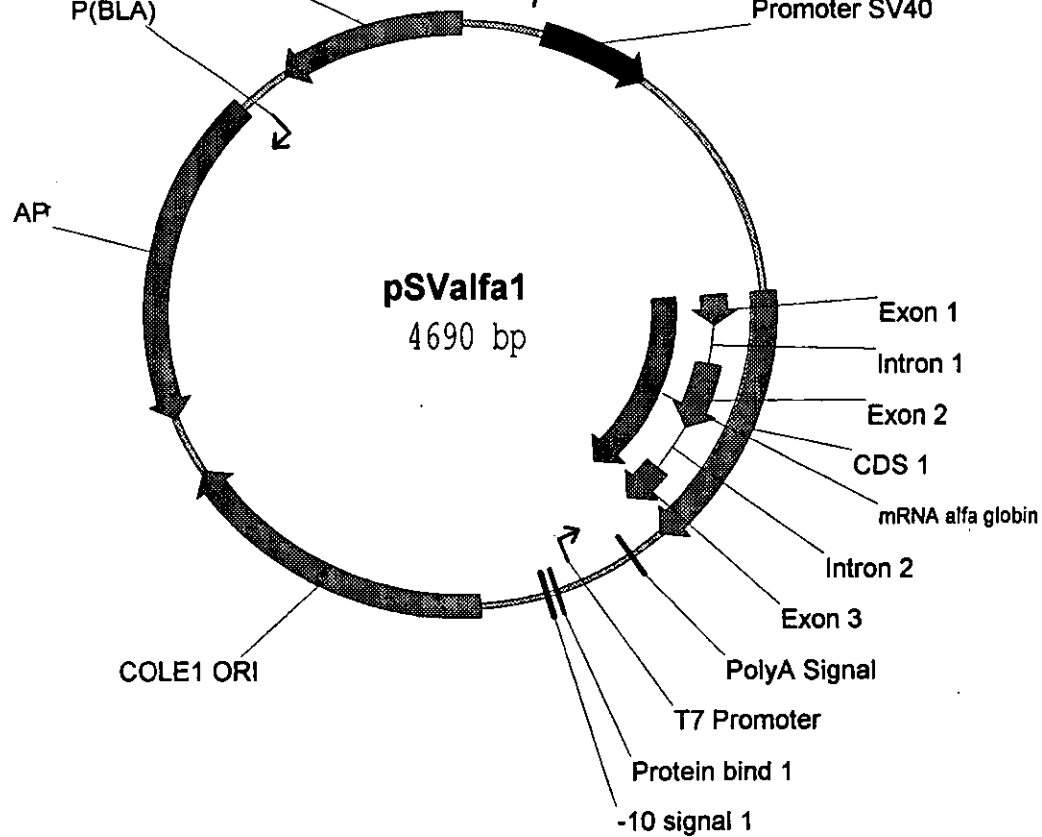


Figura 8. Plásmido pSV α 1

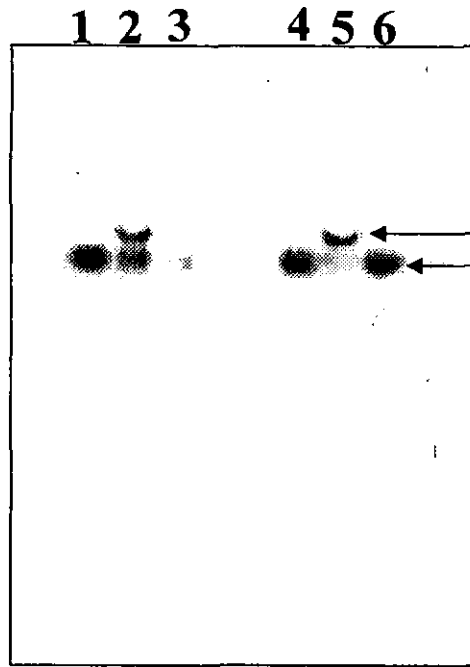


Figura 9. Alineamiento de los oligonucleótidos CTg/AgC y gAC/TCg. Carril 1, CTg; carril 2, CTg/AgC; carril 3, AgC; carril 4, gAC; carril 5, gAC/TCg; y carril 6, TCg.

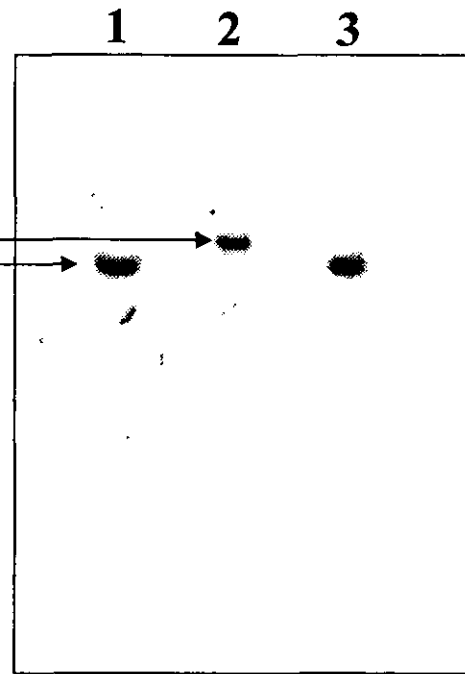


Figura 10. Alineamiento de los oligonucleótidos CCg/ggC. Carril 1, CCg; carril 2, CCg/ggC y carril 3, ggC.

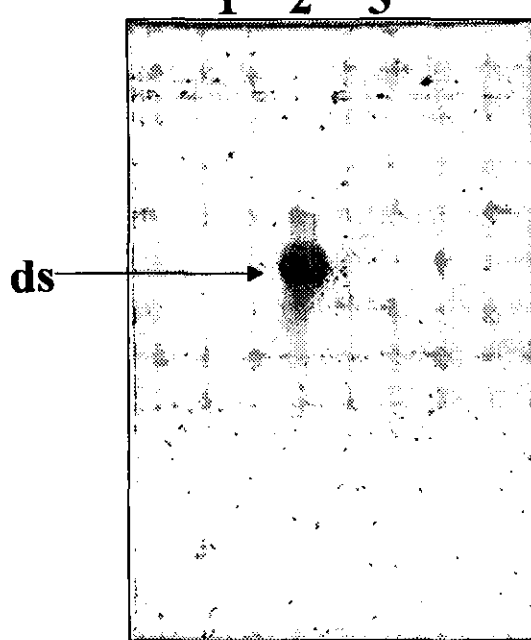


Figura 11. Alineamiento de los oligonucleótidos TTC/AAg. Carril 1, TTC; Carril 2, TTC/AAg y carril 3, AAg.

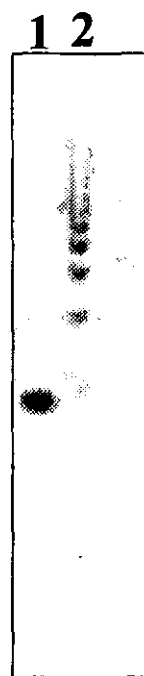
A**B**

Figura 12. Ligación de oligonucleótidos. Geles de agarosa al 2%. A. gAC/TCg, CCg/ggC y TTC/AAg. Carril 1, gAC/TCg sin ligar; carril 2, gAC/TCg ligado; carril 3, CCg/ggC sin ligar; carril 4, CCg/ggC ligado; carril 5, TTC/AAg sin ligar y carril 6, TTC/AAg ligado. B. Ligación de los oligonucleótidos CTg/AgC. Carril 1, CTg/AgC sin ligar y carril 2, CTG/AgC ligado.

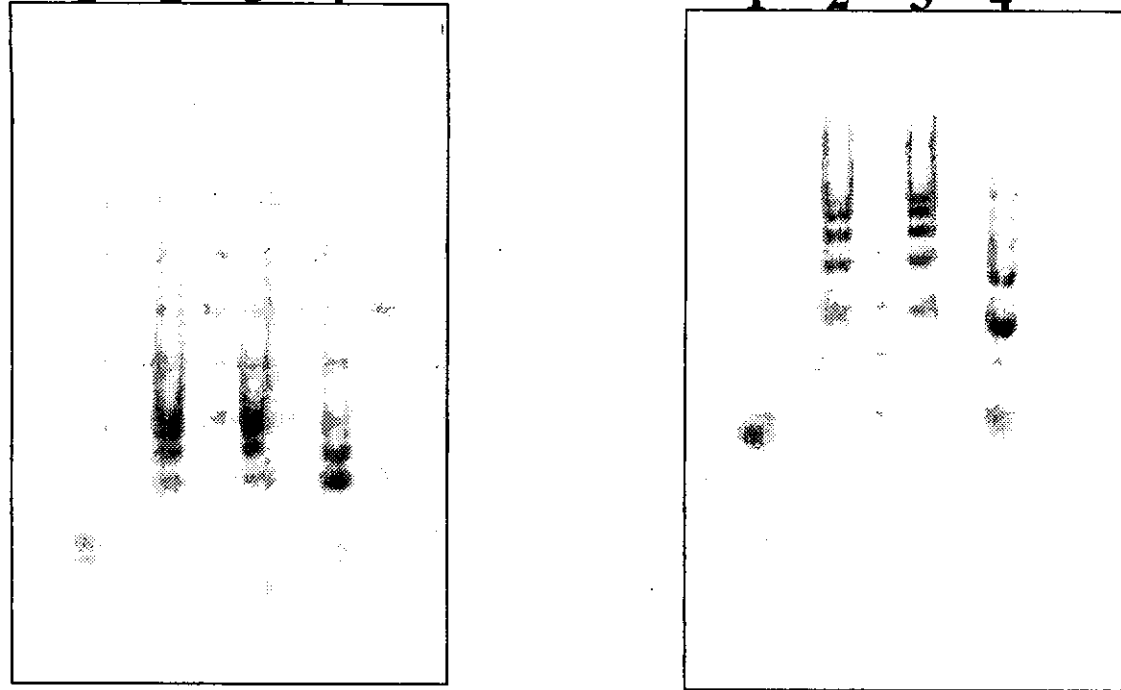


Figura 13. Ligación del oligonucleótido TTC/AAg a diferentes temperaturas. A. Gel de agarosa al 2%: Carril 1, TTC/AAg sin ligar; carril 2, ligado a 16°C; carril 3, ligado a 37°C y carril 4, ligado a -15°C. B. Gel de agarosa al 4%, con el mismo orden.

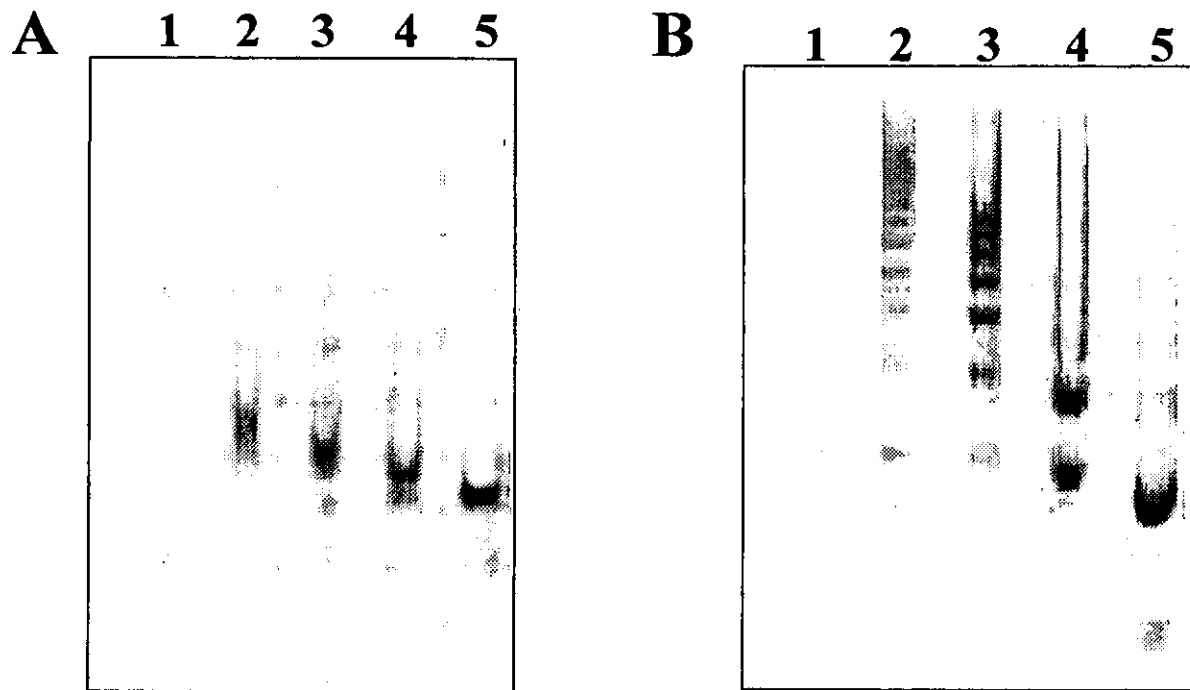


Figura 14. Ligación del oligonucleótido TTC/AAg con diferentes concentraciones. A. Gel de agarosa al 2%: Carril 1, TTC/AAg sin ligar; carril 2, 46.17 μM ; carril 3, 92.4 μM ; carril 4, 231.02 μM y carril 5, 355.77 μM . B. Gel de agarosa al 4%, con las mismas condiciones

1 2 3 4 5 6 7 8

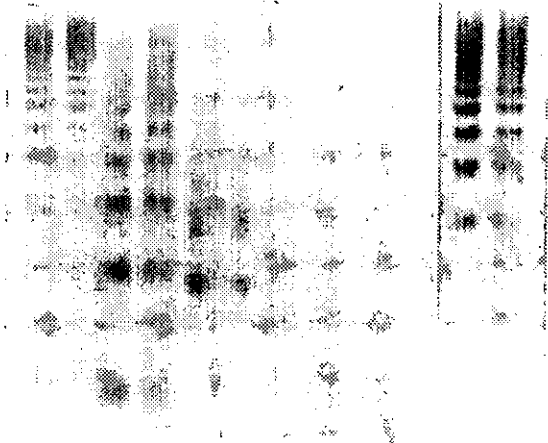


Figura 15. Segunda ligación de los oligonucleótidos gAC/TCg, CCg/ggC, TTC/AAg y CTg/AgC. Gel de agarosa al 2%. Carril 1, gAC/TCg primera ligación; carril 2, gAC/TCg segunda ligación; carril 3, CCg/ggC primera ligación; carril 4, CCg/ggC segunda ligación; carril 5, TTC/AAg primera ligación, carril 6, TTC/AAg segunda ligación, carril 7, CTg/AgC primera ligación y carril 8, CTg/AgC segunda ligación.

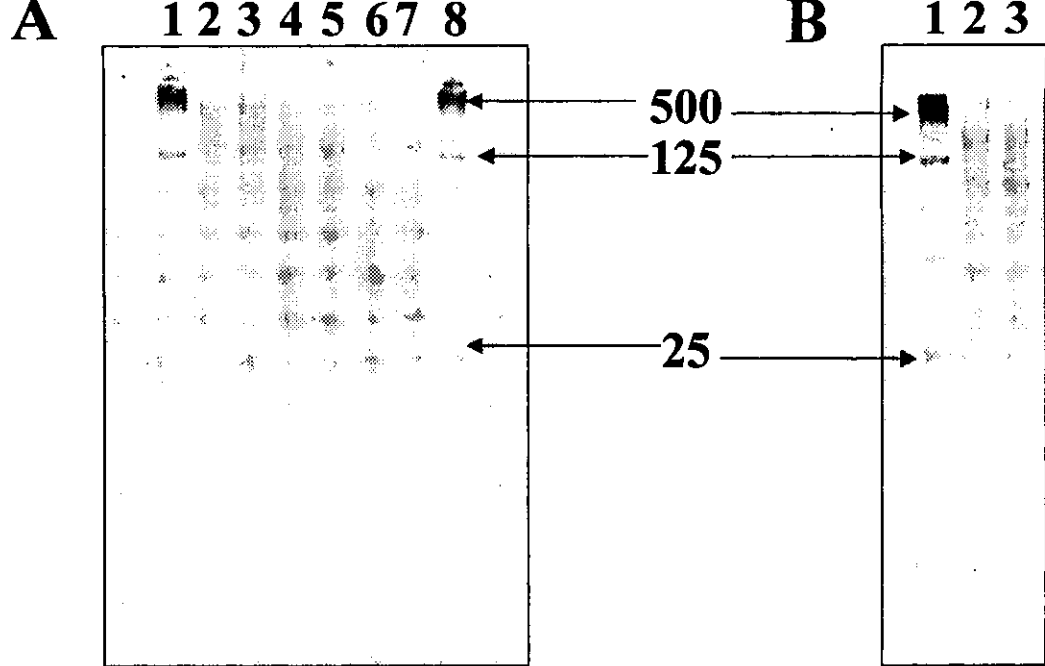


Figura 16. Tercera ligación de los oligonucleótidos gAC/TCg, CCg/ggC, TTC/AAg, y CTg/AgC.
 A. Gel de agarosa al 2%. Carril 1, escalera de 25 bp; carril 2, gAC/TCg segunda ligación; carril 3, gAC/TCg tercera ligación; carril 4, CCg/ggC segunda ligación; carril 5, CCg/ggC tercera ligación; carril 6, TTC/AAg segunda ligación; carril 7, TTC/AAg tercera ligación y carril 8, escalera de 25 bp.
 B. Gel de agarosa al 2%. Carril 1, escalera de 25 bp; carril 2, CTg/AgC tercera ligación y carril 3, CTg/AgC segunda ligación.

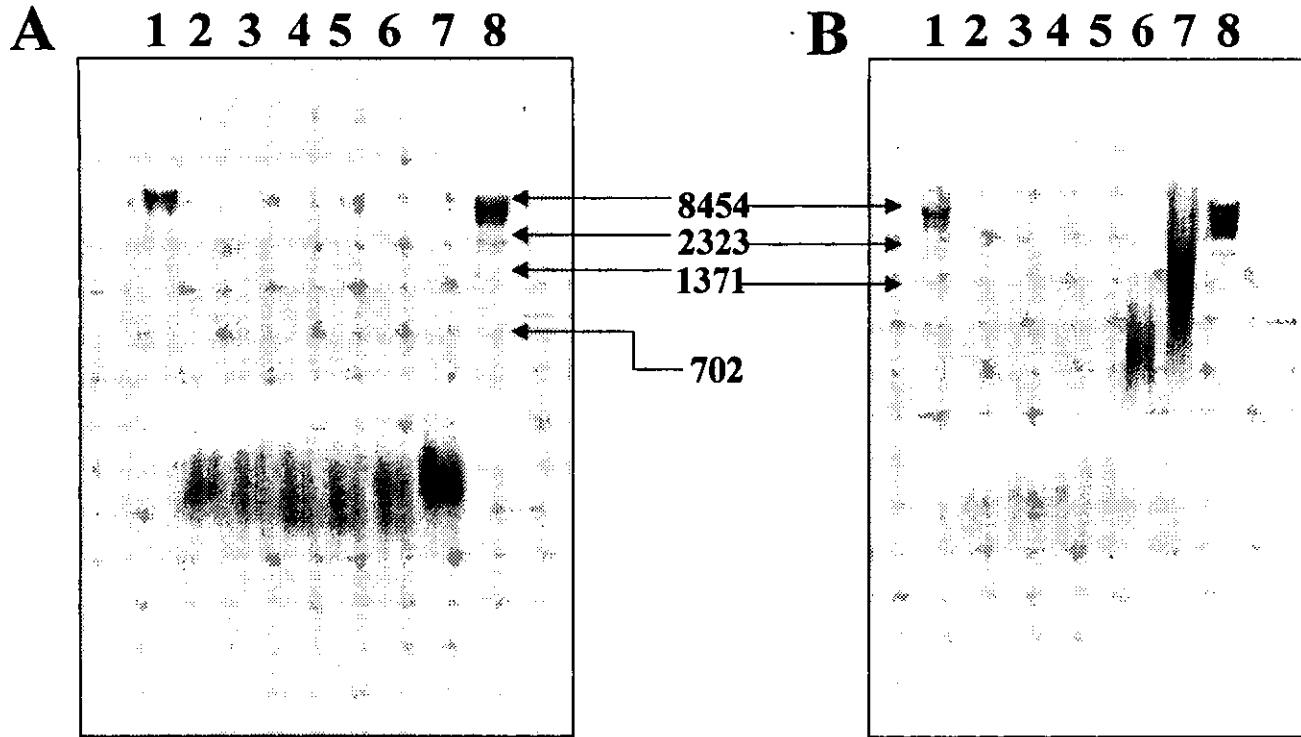


Figura 17. Amplificación de los tripletes CCg/ggC y TTC/AAG a diferentes concentraciones de cloruro de magnesio. A gel de agarosa al 1%. CCg/ggC: Carril 1, λ BstE II; carril 2, 1.5 mM; carril 3, 3.0 mM; carril 4, 4.5 mM; carril 5, 6.0 mM; carril 6, 7.5 mM; carril 7, 9.0 mM y carril 8, λ BstE II. B gel de agarosa al 1%. TTC/AAG: con las mismas condiciones

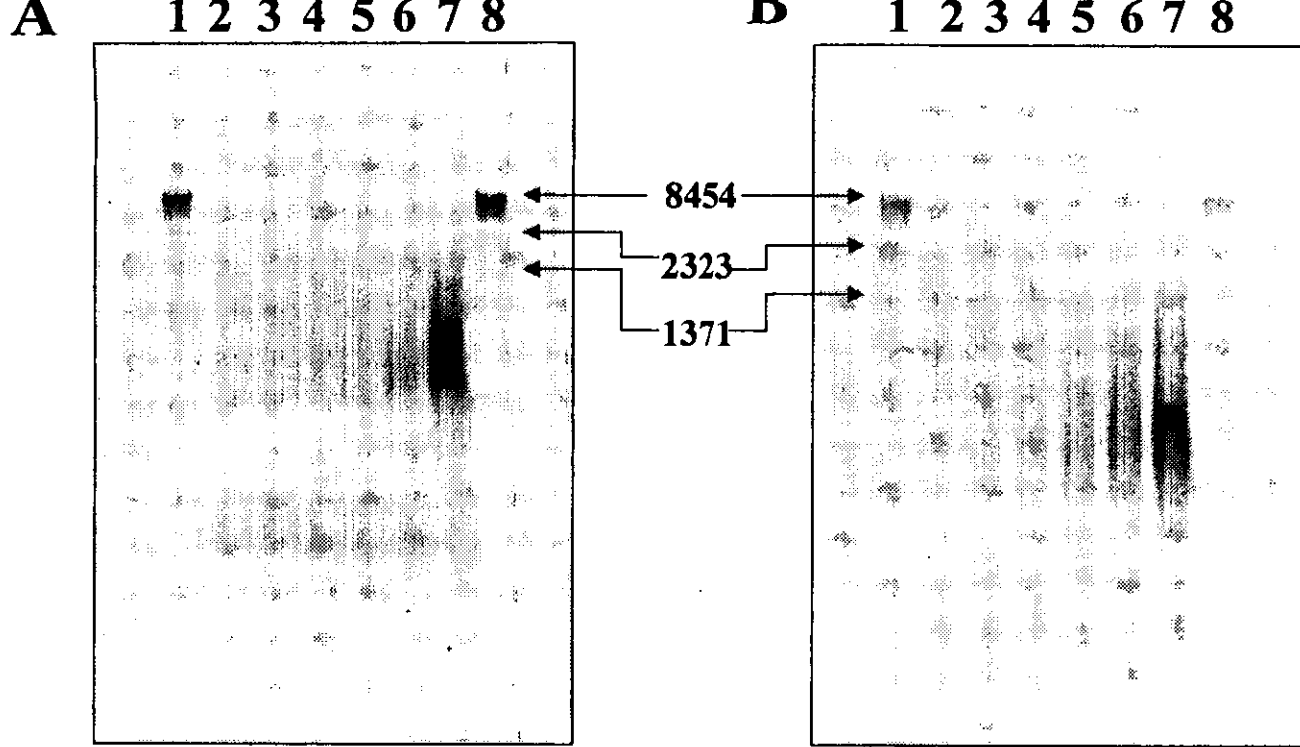


Figura 18. Amplificación de los tripletes gAC/TCg y CTg/AgC a diferentes concentraciones de cloruro de magnesio. A gel de agarosa al 1%. gAC/TCg: Carril 1, λ /BstE II; carril 2, 1.5 mM; carril 3, 3.0 mM; carril 4, 4.5 mM; carril 5, 6.0 mM; carril 6, 7.5 mM; carril 7, 9.0 mM y carril 8, λ /BstE II. B gel de agarosa al 1%. CTg/AgC: con las mismas condiciones

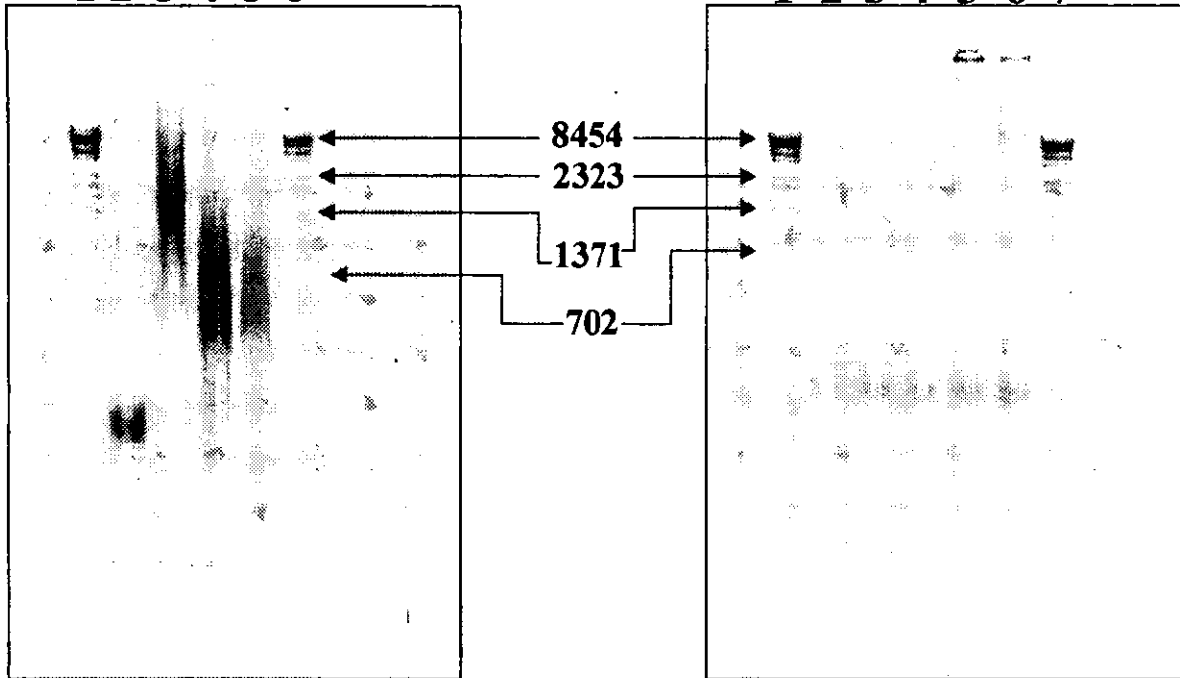


Figura 19. Expansión de tripletes repetidos a 9.0 mM de cloruro de magnesio. Gel de agarosa al 1%. Carril 1, λ BstE II; carril 2, CCg/ggC; carril 3, TTC/Aag; carril 4, CTg/AgC; carril 5, gAC/TCg y carril 6, λ BstE II.

Figura 20. Expansión y amplificación de TTC/AAg con Bgl II a diferentes concentraciones de cloruro de magnesio. Gel de agarosa al 1%. Carril 1, λ BstE II; carril 2, 7.5 mM; carril 3, 9.0 mM; carril 4, 10.5 mM; carril 5, 12.0 mM; carril 6, 13.5 mM y carril 7, λ BstE II.

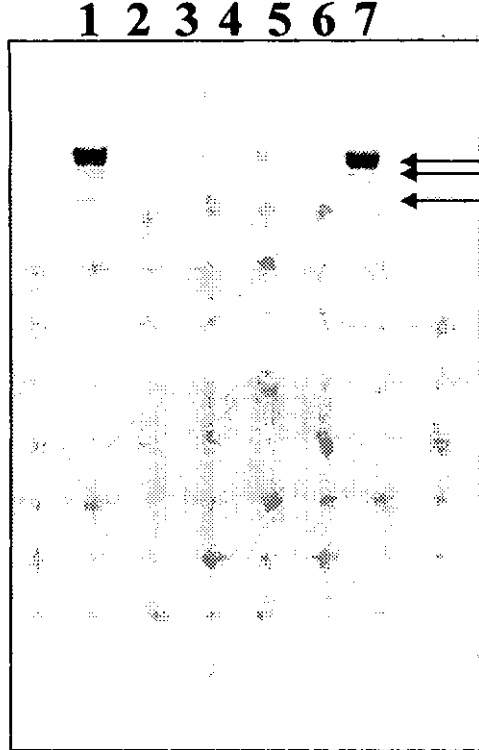


Figura 21. Expansión y amplificación de TTC/AAg con Bgl II a diferentes concentraciones de cloruro de magnesio. Gel de agarosa al 1%. Carril 1, λ /BstE II; carril 2, 2.0 mM; carril 3, 4.0 mM; carril 4, 6.0 mM; carril 5, 8.0 mM; carril 6, 10 mM y carril 7, λ /BstE II.

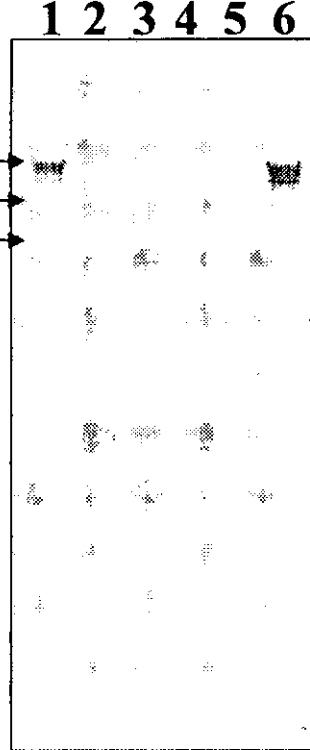


Figura 22. Expansión y amplificación de TTC/AAg con Bgl II a diferentes concentraciones de cloruro de magnesio. Gel de agarosa al 1%. Carril 1, λ /BstE II; carril 2, 4.0 mM; carril 3, 5.0 mM; carril 4, 6.0 mM; carril 5, 7.0 mM y carril 6 λ /BstE II.

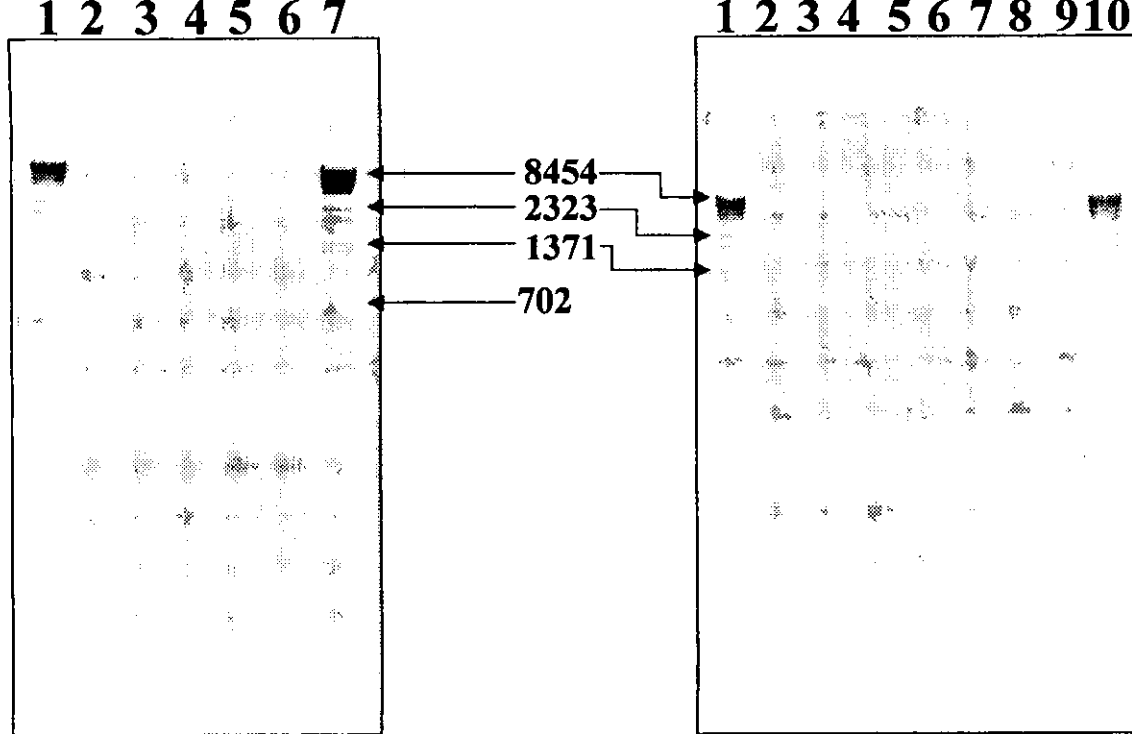


Figura 23. Expansión y amplificación de TTC/AAg con Bgl II a diferentes concentraciones de cloruro de magnesio. Gel de agarosa al 1%. Carril 1, λ BstE II; carril 2, 5.0 mM; carril 3, 5.25 mM; carril 4, 5.5 mM; carril 5, 5.75 mM; carril 6, 6.0 mM y carril 7, λ BstE II.

Figura 24. Expansión y amplificación de TTC/AAg con Bgl II a 5.5 mM de cloruro de magnesio. Gel de agarosa al 1%. Carril 1, λ BstE II; carriles 2-9, TTC/AAg 5.5 mM y carril 10, λ BstE II.

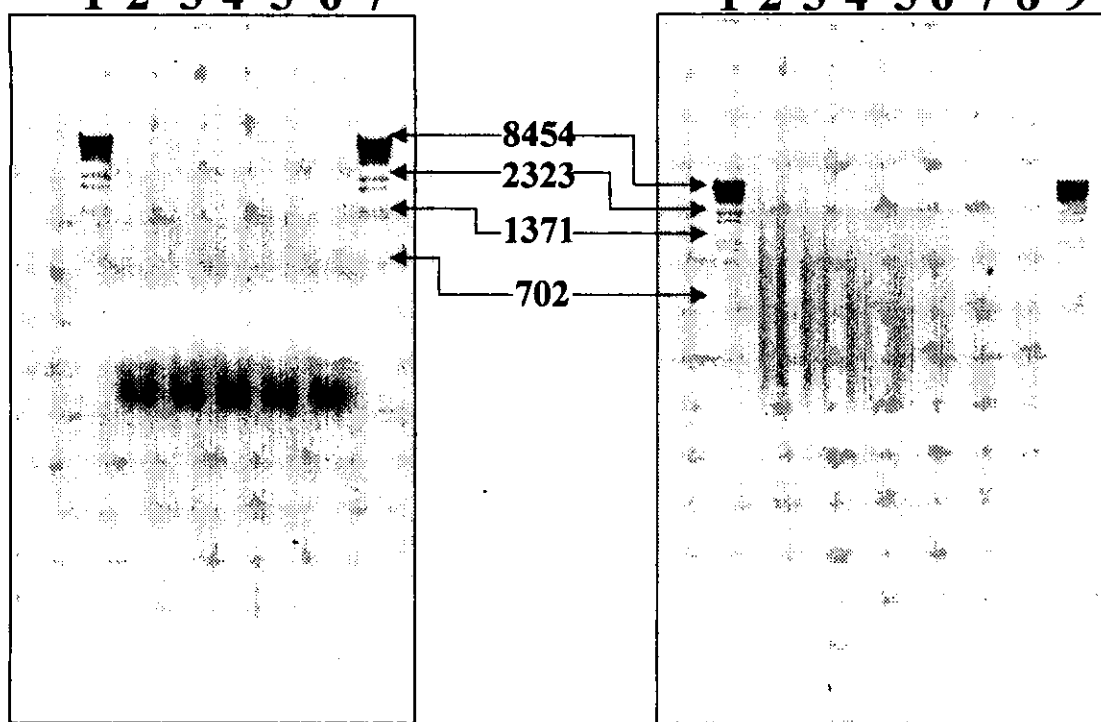


Figura 25. Expansión y amplificación de CCg/ggC con Bgl II a diferentes concentraciones de cloruro de magnesio. Gel de agarosa al 1%. Carril 1, λ BstE II; carril 2, 7.5 mM; carril 3, 9.0 mM; carril 4, 10.5 mM; carril 5, 12.0 mM; carril 6, 13.5 mM y carril 7, λ BstE II.

Figura 26. Expansión y amplificación de CCg/ggC con Bgl II a diferentes concentraciones de cloruro de magnesio. Gel de agarosa al 1%. Carril 1, λ BstE II; carril 2, 9.5 mM; carril 3, 11.0 mM; carril 4, 12.5 mM; carril 5, 14.0 mM; carril 6, 15.5 mM; carril 7, 17.0 mM; carril 8, 18.5 mM y carril 9, λ BstE II.

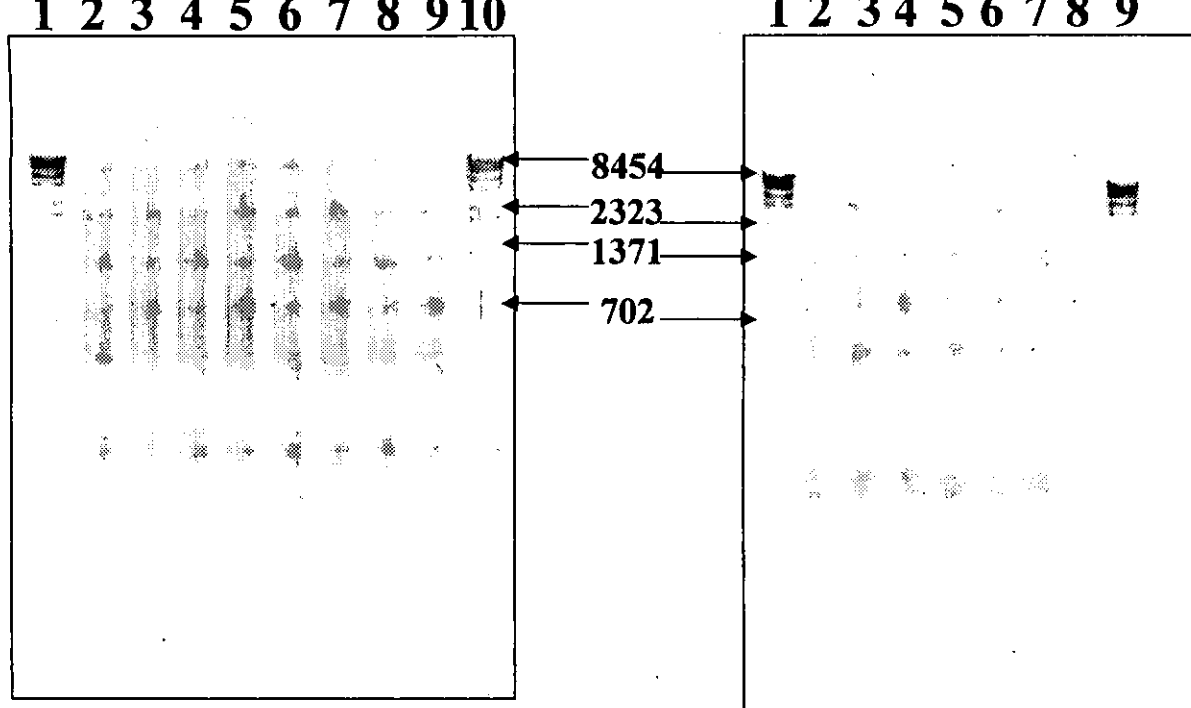


Figura 27. Expansión y amplificación de CCg/ggC con Bgl II a 9.5 mM de cloruro de magnesio. Gel de agarosa al 1%. Carril 1, λ BstE II; carriles 2-9, CCg/ggC a 9.5 mM de cloruro de magnesio y carril 10, λ BstE II.

Figura 28. Expansión y amplificación de gAC/TCg con Bgl II a diferentes concentraciones de cloruro de magnesio. Gel de agarosa al 1%. Carril 1, λ BstE II; carril 2, 7.0 mM; carril 3, 9.0 mM; carril 4, 11.0 mM; carril 5, 13.0 mM; carril 6, 15.0 mM; carril 7, 17.0 mM; carril 8, 19.0 mM y carril 9, λ BstE II.

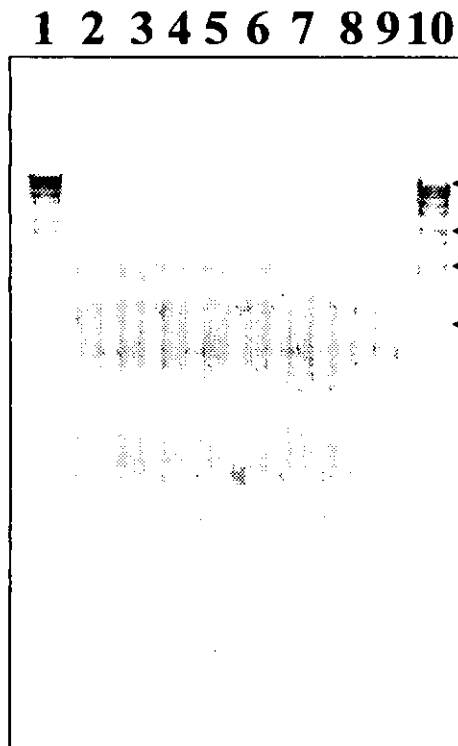


Figura 29. Expansión y amplificación de gAC/TCg con Bgl II a 9.0 mM de cloruro de magnesio. Gel de agarosa al 1%. Carril 1, λ /BstE II; carriles 2-9, gAC/TCg a 9.0 mM y carril 10, λ /BstE II.

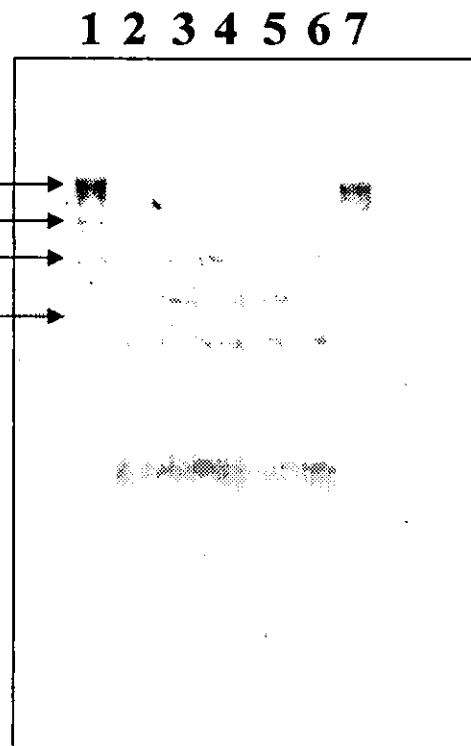


Figura 30. Expansión y amplificación de CTg/AgC con Bgl II a diferentes concentraciones de cloruro de magnesio. Gel de agarosa al 1%. Carril 1, λ /BstE II; carril 2, 7.5 mM; carril 3, 9.0 mM; carril 4, 10.5 mM; carril 5, 12.0 mM; carril 6, 13.5 mM y carril 7, λ /BstE II.

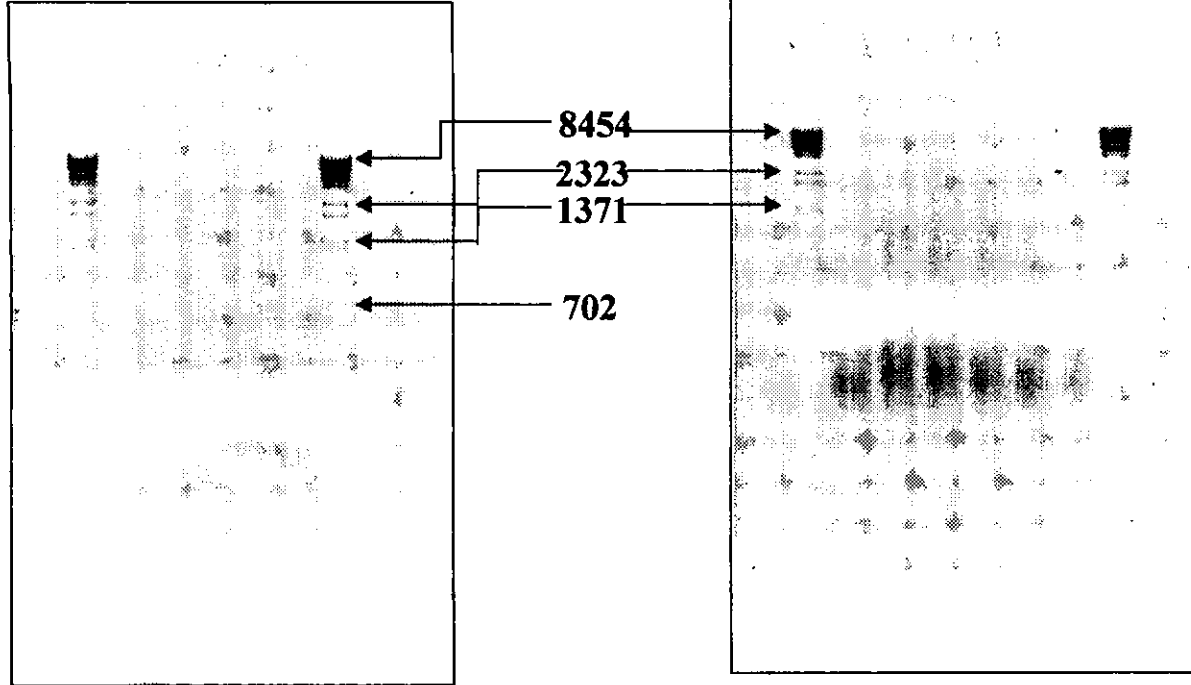


Figura 31. Expansión y amplificación de CTg/AgC con Bgl II a diferentes concentraciones de cloruro de magnesio. Gel de agarosa al 1%. Carril 1, λ BstE II; carril 2, 1.5 mM; carril 3, 4.5 mM; carril 4, 7.5 mM; carril 5, 10.5 mM; carril 6, 13.5 mM y carril 7, λ BstE II.

Figura 32. Expansión y amplificación de CTg/AgC con Bgl II a diferentes concentraciones de cloruro de magnesio. Gel de agarosa al 1%. Carril 1, λ BstE II; carril 2, 8.5 mM; carril 3, 9.5 mM; carril 4, 10.5 mM; carril 5, 11.5 mM; carril 6, 12.5 mM; carril 7, 13.5 mM y carril 8, λ BstE II.

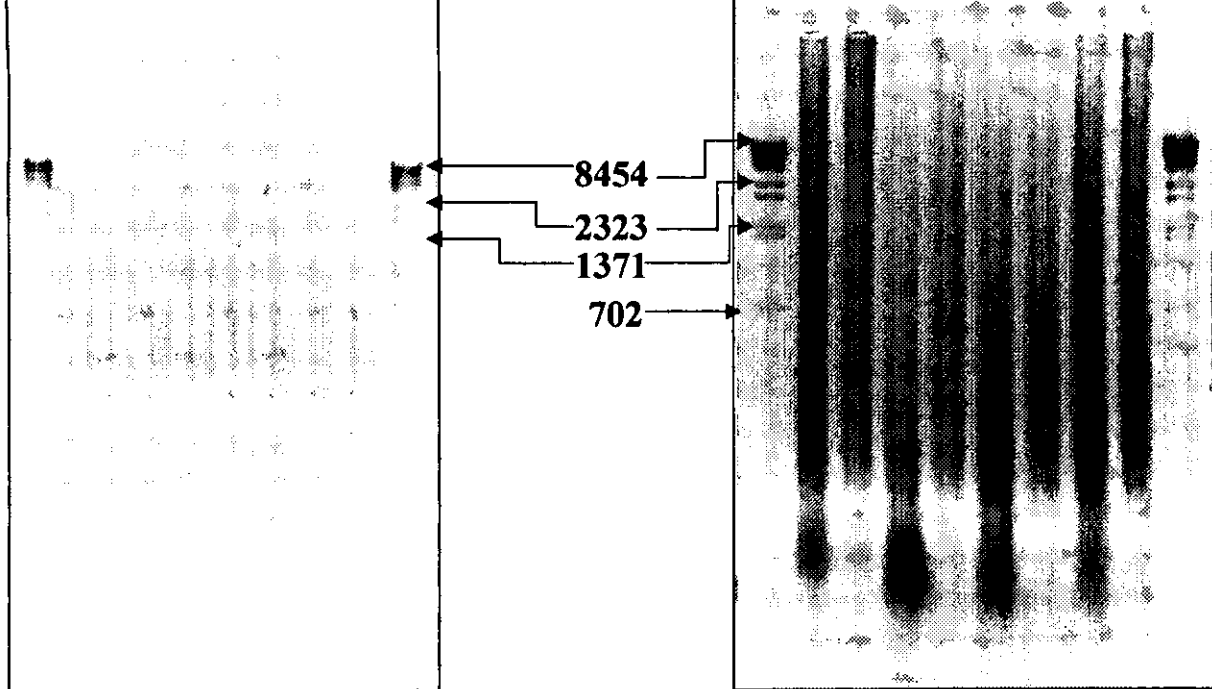


Figura 33. . Expansión y amplificación de CTg/AgC con Bgl II a 10.5 mM de cloruro de magnesio. Gel de agarosa al 1%. Carril 1, λ BstE II; carriles 2-9, CTg/AgC a 10.5 mM; carril 10, λ BstE II.

Figura 34. Restricción de las expansiones de tripletes repetidos con Bgl II con la Enzima Bgl II. Gel de agarosa al 1%. Carril 1, λ BstE II; carril 2, TTC/AAg restringido; carril 3, TTC/AAg sin restringir; carril 4, CTg/AgC restringido; carril 5, CTg/AgC sin-restringir; carril 6, gAC/TCg restringido; carril 7, gAC/TCg sin restringir; carril 8, CCg/Cgg restringido; carril 9, CCg/Cgg sin restringir; y carril 10, λ BstE II.

8454

2323

1371

702

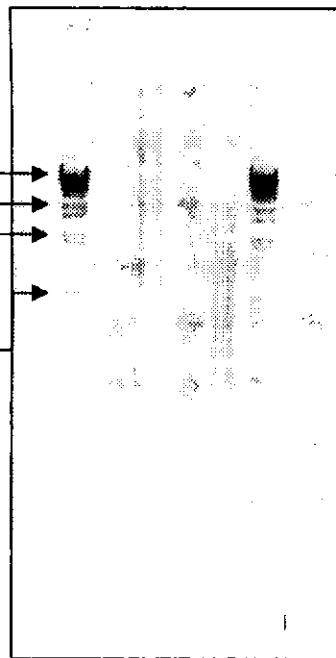


Figura 35. Eliminación de los productos de bajo peso molecular con el kit Quantum Prep Plasmid Midiprep de BIO-RAD. Gel de agarosa al 1%. Carril 1, λ BstE II; carril 2, CTg/AgC; carril 3, TTC/AAG; carril 4, gAC/TCg; carril 5, CCg/ggC y carril 6, λ BstE II.

3675

1264

702

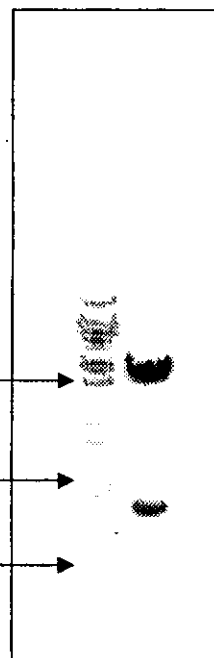


Figura 36. Restricción del plásmido pSVB10 con las enzimas Bam HI y Sma I. Gel de agarosa al 1%. Carril 1, λ BstE II; carril 2, doble restricción.

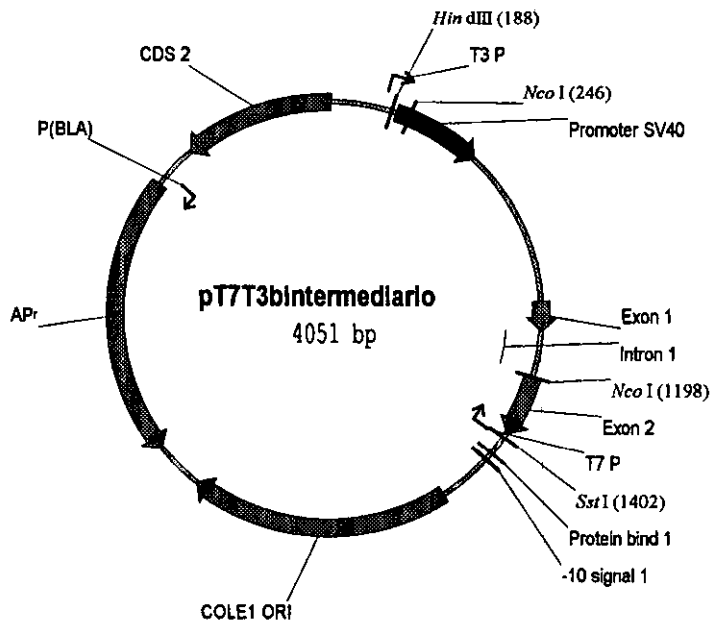
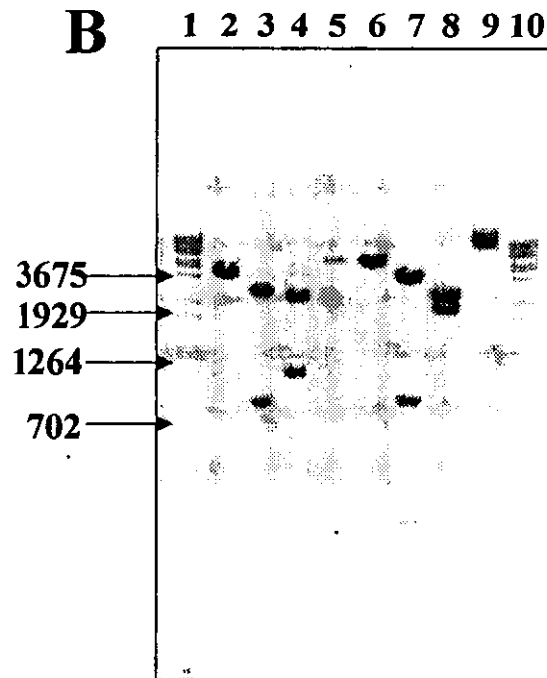
A**B**

Figura 37-. Plásmido pT7/T3- β -intermediario. A. Mapa del plásmido pT7/T3- β -intermediario. B. Gel de agarosa al 1%. Carril 1, λ /BstE II; carril 2, pT7/T3- β -intermediario/Hind III; carril 3, pT7/T3- β -intermediario/Hind III-Sst I; carril 4, pT7/T3- β -intermediario/Nco I; carril 5, pT7/T3- β -intermediario sin cortar; carril 6, pSVB10/Hind III; carril 7, pSVB10/Hind III-Sst I; carril 8, pSVB10/Nco I; carril 9, pSVB10 sin cortar y carril 10, λ /BstE II.

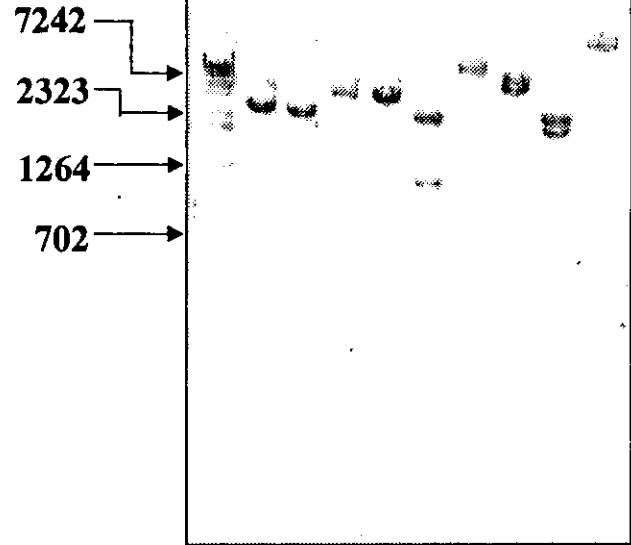
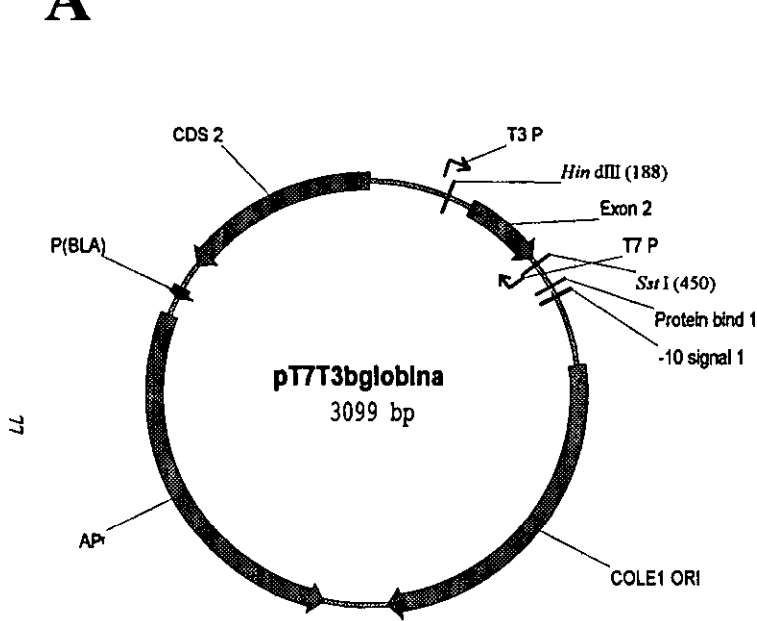


Figura 38. Plásmido final pT7T3-β-globina. A. Mapa del plásmido. B. Gel de agarosa al 1%. Carril 1, λ/BstE II; carril 2, pT7T3-β-globina /Hind III; carril 3, pT7T3-β-globina /Hind III-Sst I; carril 4, pT7T3-β-globina sin cortar; carril 5, plásmido β-intermediario/Hind III; carril 6, plásmido β-intermediario/Hind III-Sst I; carril 7, plásmido β-intermediario sin cortar; carril 8, pSVB10/Hind III; carril 9, pSVB10/Hind III-Sst I; carril 10, pSVB10 sin cortar.

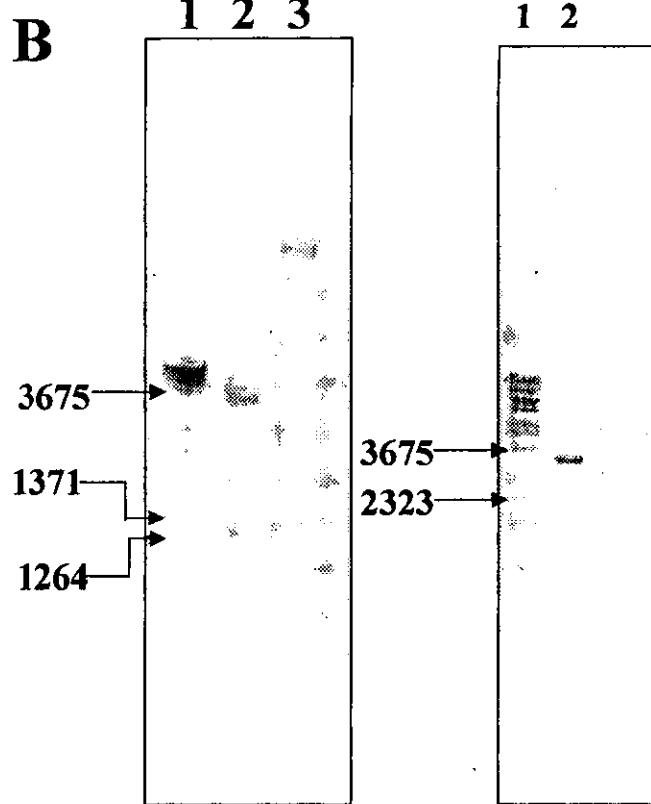
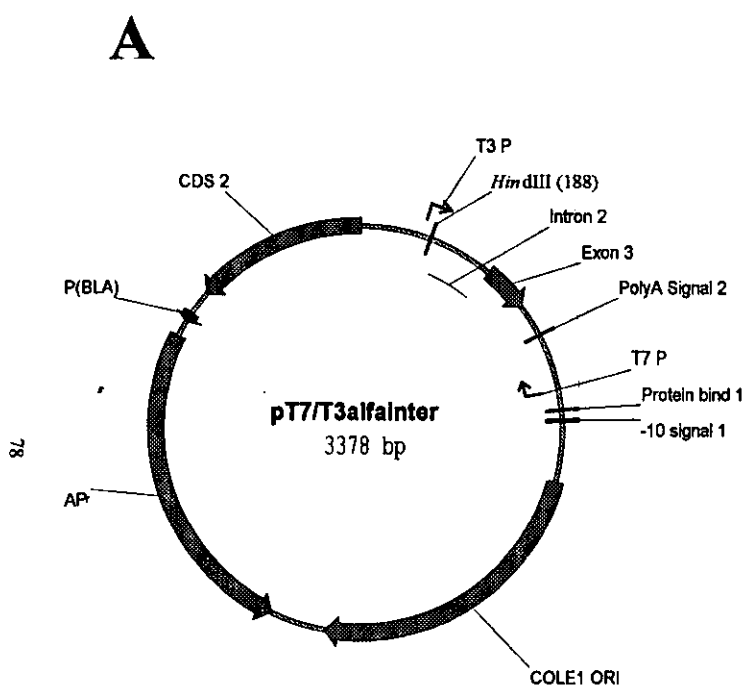


Figura 39. Plásmido pT7T3- α -intermediario. A. Mapa del plásmido. B. Geles de agarosa al 1%. Primer gel. Restricción del pSV α 1 con *Hind* III. Carril 1, λ /BstE II; carril 2, cortado con *Hind* III y carril 3, sin cortar. Segundo gel. Carril 1, λ /BstE II y carril 2, pT7T3- α -intermediario/*Hind* III.

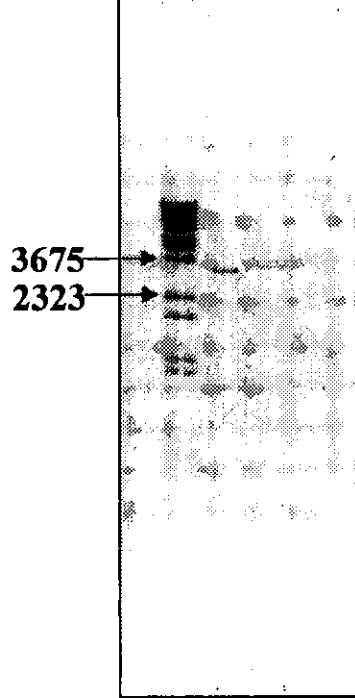


Figura 40. Restricción del pT7T3- α -intermediario con las enzimas Msc I y Sma I. Gel de agarosa al 1%. Carril 1, λ /BstE II; carril 2, pT7T3- α -intermediario/Msc I-Sma I; carril 3, pT7T3- α -intermediario /Msc I y carril 4, pT7T3- α -intermediario sin cortar.

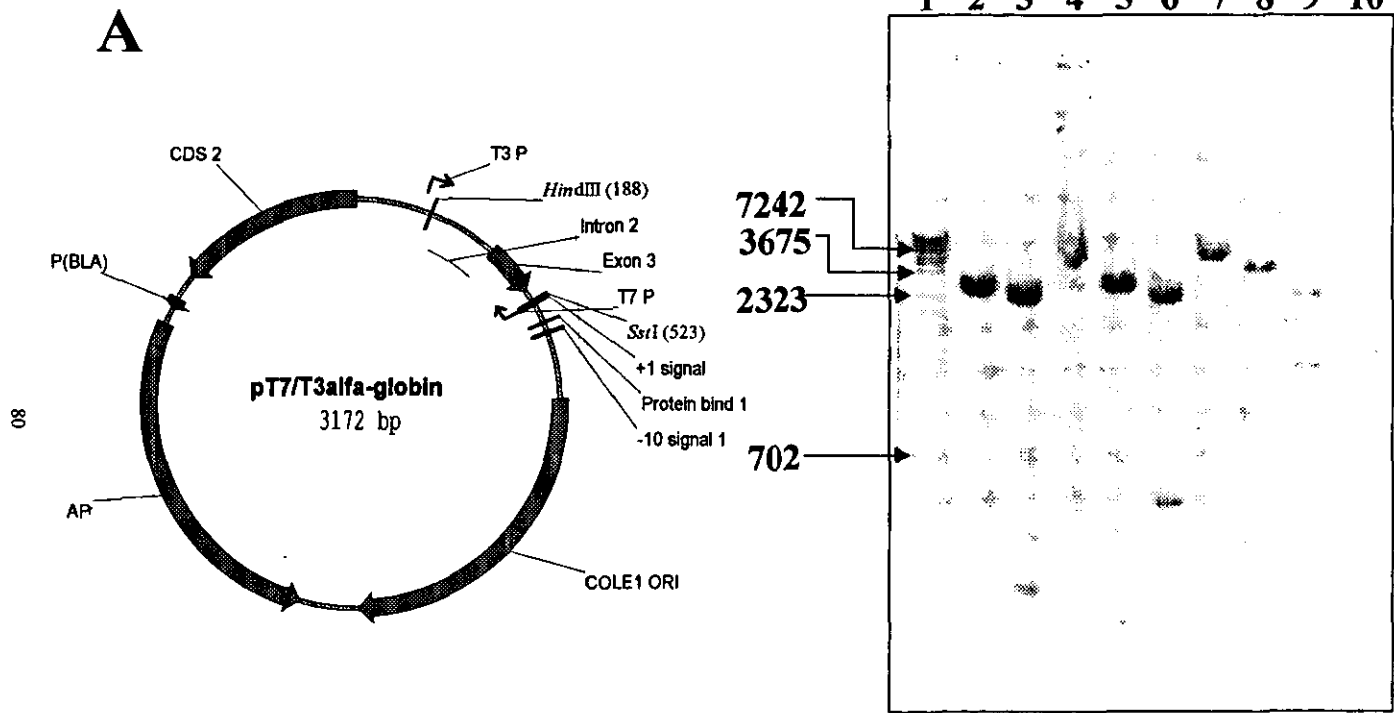


Figura 41. Plásmido final pT7T3- α -globina. A. Mapa del plásmido. B gel de agarosa al 1%. Carril 1, λ /BstE II; carril 2, pT7T3- α -globina / *Sst* I; carril 3, pT7T3- α -globina /*Hind* III-*Sst* I; carril 4, pT7T3- α -globina sin cortar; carril 5, pT7T3- α -intermediario/ *Sst* I; carril 6, pT7T3- α -intermediario/*Hind* III- *Sst* I; carril 7, pT7T3- α -intermediario sin cortar; carril 8, pSV α 1/ *Sst* I; carril 9, pSV α 1/*Hind* III- *Sst* I; carril 10, pSV α 1 sin cortar.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1. Construcción de plásmidos *in silico*

El uso de los programas computacionales orientados a la ayuda de la ciencia ha sido un gran avance, gracias a esto se han podido mejorar y optimizar las técnicas de biología molecular. El manejo de ADN en el laboratorio es de vital importancia, por esto fue necesario la construcción de los plásmidos pBBB, pSVB10 y pSV α 1. El programa Vector NTI v 5.03 de Informax Inc. Siguiendo las indicaciones en los artículos del Dr Ann-Bin. Una vez construidos los mapas de los plásmidos se facilitó su manipulación y por consiguiente los procedimientos en los cuales se utilizó este ADN fueron optimizados.

6.2. Transfección de células SH-SY-5Y

La habilidad de introducir ADN dentro de células cultivadas ha provisto de una poderosa herramienta para el estudio de la expresión de los genes. Sin embargo, el método estándar para la transfección (monocapa mediada por calcio) no es del todo satisfactorio, ya que produce una alta variación cuando se utilizan un gran número de cajas.

Como se observa en la figura 1 la transfección de las células SH-SY-5Y en monocapa mediada por calcio es la más eficiente, sin embargo, la variación en la medición entre cada una de las placas fue muy grande (ver tabla 3). Es de esta manera como se pone de manifiesto el problema que surge al transfectar por este método a varias placas. Esta variación entre cada placa se disminuye considerablemente cuando se incubó la suspensión de células con el precipitado DNA-CaPO₄ (Weihung Song, 1995). De esta forma se promueve la misma interacción de todas las células a ser transfectadas con el precipitado de ADN, resultando una variación muy baja (tabla y 3 figura5) aunque la capacidad de transfección no sea tan buena. Si este método se compara con el método comercial de transfección con liposomas (LipofectaminaPlus) la capacidad de transfección es muy semejante. Desafortunadamente al igual que la transfección con el método estándar al utilizar la LipofectaminaPlus hay una gran variación entre cada una de las placas (tabla 3). Con el método en suspensión se logró optimizar la transfección de ADN a las células SH-SY-5Y de una forma adecuada y lo que es más importante la variación en la capacidad de transfección se disminuyó considerablemente con respecto al método estándar.

3. Expansión de tripletes repetidos

Los parámetros a ser controlados para la PCR son entre otros la temperatura de desnaturalización del ADN, la temperatura de alineamiento, la temperatura de alargamiento, concentración de primers, concentración de templado y la concentración del cofactor de la enzima el magnesio (en forma de MgCl₂).

El magnesio es un cofactor esencial para la DNA polimerasa usada en la PCR, y su concentración debe ser estandarizada para cada par templado-primero. Varios componentes presentes en la reacción unen al ión magnesio, incluyendo a los primers, templado, dNTPs y los productos de PCR. Por esto es necesario que haya magnesio libre para que pueda activar a la DNA polimerasa. Como el magnesio es uno de los principales parámetros que se deben controlar en una reacción de PCR no es sorprendente que la la enzima Taq polimeraza haya podido expandir a los tripletes repetidos al variar la concentración de este ión.

En la primera reacción de PCR se utilizó la misma variación en la concentración de magnesio para todos los tripletes (figuras 18 y 19) las concentraciones fueron 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 7.5 y 9.0 mM. El comportamiento de cada triplete fue distinto, sin embargo, en la concentración de 9.0 mM se observa una buena expansión para los tripletes TTC/AAg, gAC/TCg y CTg/AgC. Lo contrario ocurrió con el triplete CCg/ggC en el cual no se observa una expansión aparente, ya que las secuencias ricas en citocinas y guaninas por sus propiedades fisicoquímicas tan peculiares son difíciles de amplificar porque el par C♦G es más fuerte. No obstante al realizar el PCR con los primers que contienen el sitio Bgl II cambia considerablemente su comportamiento y se observa una buena expansión de CCg/ggC (figura 27). Cuando la concentración de magnesio se varia en un intervalo de 9.5, 11.0, 12.5, 14.0, 15.5, 17.0 y 18.5 mM. se logra amplificar a este repetido, esto podría explicarse a que al encontrarse una secuencia que contiene bajo contenido en citocinas (el sitio Bgl II adicionado) cambian las propiedades del triplte CCg/ggC, siendo la concentración de 9.5 mM de magnesio la óptima para la expansión (figura 28).

Los tripletes gAC/TCg y CTg/AgC muestran al igual que CCg/ggC la necesidad de una alta concentración de magnesio. Para gAC/TCg es de 9.0 mM (figura 30) y para CTg/AgC de 10.5 mM (figura 34). La dependencia de una alta concentración de magnesio se relaciona con la cantidad de guaninas y citocinas presentes en la secuencia. Así observamos que para TTC/AAg la dependencia de calcio fue diferente ya que la mejor expansión se obtuvo a la concentración de 5.5 mM de magnesio (figura 25), debido a la baja proporción de guaninas y citocinas presentes en la secuencia.

La concentración del magnesio para la expansión es crítica y el ión puede actuar en dos formas diferentes. La primera es a la alta concentración de magnesio las estructuras que forman las expansiones de los tripletes repetidos sean más estables que a bajas concentraciones. Por consecuencia al ocurrir el proceso de desnaturalización en la PCR y al bajar la temperatura para el alineamiento estas estructuras ya se encuentran perfectamente formadas y pueden existir extremos con el grupo 3' hidroxilo expuesto que sirve como un sitio de anclaje para la Taq DNA polimerasa. De esta forma se repetiría la polimerización en un sitio en el cual no se encuentra un primer, este proceso continuará durante todos los ciclos de la reacción de PCR. El segundo mecanismo involucra a la propia enzima. La Taq DNA polimerasa une al magnesio para ser activada y realizar su función. Al encontrarse una gran cantidad de este ión, la enzima puede cambiar sus propiedades. Esto le puede conferir la capacidad para reiniciar el proceso de polimerización en diferentes sitios donde pueda unirse al templado sin soltar la nueva cadena sintetizada.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

- Se logró establecer el cultivo de las células SH-SY-5Y y su adecuada transfección.
- El método de transfección en suspensión mediada por calcio elimina la variación en la capacidad de transfección disminuyendo el error producido por el método de transfección en monocapa mediada por calcio.
- Se logró la expansión de los tripletes repetidos *in vitro*.
- La expansión de los tripletes es dependiente de la concentración del cloruro de magnesio presente en la reacción.
- La dependencia de la concentración de magnesio para la expansión de los tripletes se basa en la cantidad de guaninas y citocinas presentes en la secuencia del ADN. A mayor cantidad de guaninas y citocinas se requiere de una mayor concentración de magnesio.
- La construcción de los plásmidos pT7T3- β -globina y pT7T3- α -globina se concluyó satisfactoriamente y los mapas son conocidos.

8. REFERENCIAS

8. REFERENCIAS

1. Ann-Bin S., Greenberg E. Michael and Belasco G. Joel. (1989) The c-fos transcript is targeted for rapid decay by two distinct mRNA degradation pathways. *Gen. Develop.* 3: 60-72.
2. Ann-Bin S., Greenberg E. Michael and Belasco G. Joel. (1991) Two distinct destabilizing elements in the c-fos message trigger deadenylation as a first step in rapid mRNA decay. *Gen. Develop.*; 5: 221-231.
3. Ashley J. C. T. and Warren S. T. (1995). Trinucleotide repeat expansion an human disease. *Annu. Rev. Genet.* 29:703-728.
4. Aslanidis C., Jansen G., Amemiya C., Shutler G., Mahadevan M., and Tsilfidis C. (1992). Cloning of the essential myotonic dystrophy region and mapping of the putative defect. *Nature.* 355:548-551.
5. Bianchi M. E. and Beltrame M. (1998). Flexing DNA: HMG-box proteins and their partners. *Am. J. Hum. Genet.* 63:1573-1577.
6. Brook J. D., McCurrach M. E., Harley H.G., Bucler A. J., Church D. and Aburatani H. (1992). Molecular basis of myotonic dystrophy expansion of a trinucleotide CTG repeat at the 3' end of the transcript encoding a protein kinase family member. *Cell.* 68:799-808.
7. Campuzano V., Montermini L., Molto M. D., Pianase L., Cossee M. and Cavaleanti F. (1996). Friedrich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science.* 271:1423-1427.

8. Chastain P.D. and Sinden R.R. (1998). CTG repeats associated with human genetics disease are inherently flexible. *J. Mol. Biol.* **275:405-411**.
9. Chastain P.D., Eichler E.E., Kang S., Nelson L.D., Levene D.S. and Sinden R.R. (1995). Anomalous rapid electrophoretic mobility of DNA containing triplet repeats associated with human disease genes. *Biochem.* **34:16125-16131**.
10. Ciccarone V., Spengler A.B., Meyers B.M., Biedler L. J. and Ross A. R. (1989). Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Res.* **49:219-225**.
11. Davis M. J. (1994). Basic cell culture. Oxford University Press. New york.
12. Freudenreich H.C., Stavenhagen B.J. and Zakian A.V. (1997). Stability of a CTG/CAG trinucleotide repeat in yeast is dependent on its orientation in the genome. *Mol. Cell Biol.* **17:2090-2098**.
13. Gacy M.A. and McMurray T.C. (1998). Influence of hairpins on template reannealing at trinucleotide repeat duplexes: a model for slipped DNA. *Biochem.* **37:9426-9434**.
14. Kang S., Jaworski A., Ohshima K. and Wells R.D. (1995). Expansion and deletion of CTG triplet repeats from human disease genes are determined by the direction of replication in *E.coli*. *Nat. Genet.* **10:213-218**.
15. Krasilnikov A.S., Panyutin I.G., Samadashwily G.M., Cox R., Lazurkin Y.S. and Mirkin S.M. (1997). Mechanisms of triplex-caused polymerization arrest. *Nucl. Acids Res.* **25:1339-1346**.

16. Kremer E.J., Pritchard M., Lynch M. Yu S., Holman K. and Baker E. (1991). Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CGG)_n. *Science*. **252**:1711-1714.
17. Mariappan S., García E.A. and Gupta G. (1996). structure and dynamics of the DNA hairpins formed by tandemly repeated CTG triplets associated with myotonic dystrophy. *Nucl. Acids Res.* **24**:775-783.
18. Mitas Michael (1997). Trinucleotide repeats associated with human disease. *Nucl. Acids Res.* **25**:2245-2253.
19. Nianhua X., Chyi-Ying A.C. and Ann-Bin S. (1997). Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay. *Mol.Cell.Biol.* **17**:4611-4621.
20. Paulson H.L. and Fischbeck K.M. (1996). Trinucleotide repeats in neurogenetic disorders. *Ann. Rev. Neurosci.* **19**:79-107.
21. Pearson C.E. and Sinden R.R. (1996). Alternative DNA structures within the trinucleotide repeats of the myotonic dystrophy and fragile X locus. *Biochem.* **35**:5041-5053.
22. Rosche A.W., Jaworski A., Kang S., Kramer F.S., Larson E.J., Geidroc P.D., Wells D. R. and Sinden R.R. (1996). Single-strand DNA-binding protein enhances the stability of CTG triplet repeats in *E.coli*. *J. Bact.* **178**:5042-5044.
23. Sambrook-Fritsch-Maniatis. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* (1989). 2a edición. Editorial: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

24. Schumacher S., Fuchs R.P.P. and Bichara M. (1998). Expansion of CTG repeats from human disease genesis dependent upon replication mechanisms in *E.coli*- the effect of long patch mismatch repair revisited. *J. Mol. Biol.* **279**:1101-1110.
25. Sinden R. Richard. (1999). Biological implications of the DNA associated with disease-causing triplet repeats. *Am. J. Hum. Genet.* **64**:346-353.
26. Sinden R.R. and Wells R.D. (1992). DNA structure, mutations, and human genetic disease. *Curr. Opin. Biotechnol.* **3**:612-622.
27. Timchenko L.t. and Caskey C.T. (1999). Triplet repeat disorders: discussion of molecular mechanisms. *Cell. Mol. Life. Sci.* **55**:1432-1447.
28. Usdin K. (1998). NGG-triplet repeats form similar intrastrand structures: implications for the triplet expansion diseases. *Nucl. Acids Res.* **26**:4078-4085.
29. Verker A.J., Pieretti M., Sutcliffe J.S. Fu Y.-H., Kuhl D. P. A. and Pizzuti A. (1991). Identification of a gene (FMR-1) coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell.* **65**:905-914.
30. Weihong Song and Lahiri Debomoy K. (1995) Efficient transfection of DNA by mixing cells in suspension with calcium phosphate. *Nuc. Acids Res.*; **23**: 3609-3611.
31. Wells R.D. and Warren S. T. (1998). Genetic instabilities and hereditary neurological diseases. Academic Press, San Diego.
32. Yu A., Dill J., Wirth S.S., Huang G., Lee H.V., Haworth S.I. and Mitas M. (1995). The trinucleotide repeat sequence d(GTC)₁₅ adopts a hairpin conformation. *Nucl. Acids Res.* **23**:2706-2714.